

Aus dem Forschungszentrum Kubus
der Kinderklinik und Kinderpoliklinik
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Direktor: Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Ludwig-Maximilians-Universität München

**Analyse des Mechanismus der zellulären Aufnahme
und des Einflusses zytoplasmatischer Bestandteile
auf die Dissoziation DNA-beladener Nanopartikel**

DISSERTATION

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Stephanie Huth
aus
Würzburg

2005

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter:	Prof. Dr. D. Reinhardt
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. J. Behr Priv. Doz. Dr. A. Eigler
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Priv. Doz. Dr. J. Rosenecker
Dekan:	Prof. Dr. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	29. November 2005

Meiner Mutter
gewidmet

Teile der vorliegenden Dissertation wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

- **S. Huth, J. Lausier, S. W. Gersting, C. Rudolph, C. Plank, U. Welsch, and J. Rosenecker.** 2004. Insights into the mechanism of magnetofection using PEI-based magnetofectins for gene transfer. *J. Gene Med.* **6**:923-936.
- **S. Huth, C. Rudolph, D. Reinhardt und J. Rosenecker.** 2004. Einblicke in den Mechanismus der Magnetofektion. *Zeitschrift der Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie* **7**:18-21.
- **U. Schillinger, T. Brill, C. Rudolph, S. Huth, S. Gersting, F. Krotz, J. Hirschberger, C. Bergemann, and C. Plank.** 2005. Advances in magnetofection – magnetically guided nucleic acid delivery. *J. Magn. Magn. Mat.* **293** (1): 501-508.
- **S. Huth, F. Hoffmann, A. Laner, D. Reinhardt, J. Rosenecker, and C. Rudolph.** 2005. Cytosolic RNA induces disassembly of polyamine gene vectors as a precondition for nuclear import of plasmid DNA and gene expression. (*eingereicht*)

Tagungsbeiträge (Abstracts):

- **S. Huth, J. Lausier, C. Rudolph, C. Plank, S. Gersting, U. Welsch und J. Rosenecker.** 2003. Charakterisierung des Mechanismus der Magnetofektion. Atemwegs- und Lungenerkrankungen - Zeitschrift für Diagnostik und Therapie. **29/4**:S.203:D13. (25. Jahrestagung der Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie (GPP), 24.-26. April 2003 in Wien)
- **S. Huth, J. Lausier, C. Rudolph, C. Plank, S. Gersting, U. Welsch, and J. Rosenecker.** 2003. Characterization of the mechanism of magnetofection. *Molecular Therapy*. **7**(5):S372:967. (6th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy (ASGT), June 4-8, 2003, Washington D.C.)

- **S. Huth, C. Rudolph, D. Reinhardt und J. Rosenecker.** 2004. Die Rolle der Caveolae für die Aufnahme bzw. den intrazellulären Transport von synthetischen Genvektoren in der somatischen Gentherapie. Atemwegs- und Lungenerkrankungen - Zeitschrift für Diagnostik und Therapie. **30/3**:S.150: E04. (26. Jahrestagung der Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie (GPP), 25.-27. März 2004 in Hamburg)
- **S. Huth, F. Hoffmann, J. Rosenecker, D. Reinhardt und C. Rudolph.** 2004. Studies on the nuclear import of plasmid DNA (pDNA) using non-viral gene vectors – a potential role for RNA to disintegrate gene vectors within the cytoplasm. Abstract book of the 12th Annual Congress of the European Society of Gene Therapy (ESGT), p.71, P117. (4 – 7 November, 2004, Tampere, Finland)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADA	Adenosindeaminase
ATP	Adenosintriphosphat
B-PEI	Branched PEI
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	complementary DNA
CF	Zystische Fibrose, Mukoviszidose
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
DAPI	4', 6-Diamidin-2-Phenylindol
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco`s Minimal Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOTAP	1,2-Dioleyl-sn-glycero-3-trimethylammoniumpropan
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Foetal Calf Serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Forward Angle Light Scatter
GDEPT	Gene-directed Enzyme Prodrug Therapy
HBS	Hepes Buffered Saline
L-PEI	Linear PEI
MEM	Minimal Essential Medium
NLS	Nuclear Localizing Signal
NPC	Nuclear Pore Complex
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEI	Polyethylenimin
PI	Propidiumiodid
PLL	Poly-L-Lysin
OTC	Ornithin-Transcarbamylase

PMA	Phorbolmyristataacetat
RLU	Relative Light Units
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SLN	Solid Lipid Nanoparticles
SSC	Side Angle Light Scatter
SV40	Simian Virus 40
TP	Transportpuffer
Tris	N, N, N-Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer RNA
ZL	Zelllysat

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Die somatische Gentherapie – Grundlagen und Perspektiven.....	1
1.1.1 Grundlagen	1
1.1.2 Genvektoren	2
1.1.3 Klinische Studien	4
1.1.4 Zukunftsaussichten.....	6
1.2 Synthetische (nicht-virale) Genvektorsysteme	7
1.3 Aufnahme und intrazellulärer Transport synthetischer Genvektorkomplexe	11
1.3.1 Endozytose als Aufnahmemechanismus	12
1.3.2 Import über Caveolae – ein alternativer Aufnahmemechanismus	13
1.4 Die Methode der Magnetofektion	14
1.5 Die Zellkernmembran als weitere Barriere für den erfolgreichen Gentransfer	16
1.6 Zielsetzung der Dissertation	17
2. MATERIAL UND METHODEN	19
2.1 Zellkultur	19
2.1.1 Verwendete Zelllinien	19
2.1.2 Anzuchtbedingungen und Subkultivierung	19
2.1.3 Kulturmedien und Supplemente.....	20
2.2 Präparation der Genvektorkomplexe.....	20
2.2.1 Verwendete Plasmide und Vektoren	20
2.2.2 Das N/P-Verhältnis	22
2.2.3 Herstellung der Komplexe	23
2.3 Magnetofektion bzw. Transfektion.....	27
2.3.1 Inhibierung der Endozytose	28
2.4 Bestimmung der Luziferaseaktivität	30
2.5 Untersuchungen zur Zellvitalität.....	31
2.6 Nachweis der Endozytoseaktivität.....	31
2.7 Untersuchungen zur Kolo-kalisation der Genvektorkomplexe mit Caveolae	32
2.7.1 <i>in vitro</i>	32
2.7.2 <i>in vivo</i>	33
2.8 Gewinnung isolierter und intakter Zellkerne.....	34
2.8.1 Dichtegradientenzentrifugation.....	34

2.8.2 Tests zur Intaktheit der Zellkerne.....	34
2.9 Studien an isolierten Zellkernen	36
2.10 Durchflußzytometrie	36
2.11 Southern Blot Analyse	37
2.12 Mikroskopie	38
2.12.1 Elektronenmikroskopie	38
2.12.2 Epifluoreszenzmikroskopie	38
2.12.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	39
2.13 Statistische Auswertungen.....	39
3. ERGEBNISSE.....	40
3.1 Charakterisierung des Mechanismus der Magnetofektion	40
3.1.1 Die zelluläre Aufnahme und der intrazelluläre Transport von transMAG ^{PEI} -Partikeln..	40
3.1.2 Die zelluläre Aufnahme und der intrazelluläre Transport von transMAG ^{PEI} /DNA-Komplexen.....	42
3.1.3 Einfluss von Endozytoseinhibitoren auf die Effizienz von Magnetofektion bzw. Transfektion.....	45
3.1.4 Endozytoseaktivität der ausgewählten Zelllinien.....	54
3.1.5 Einfluss des magnetischen Feldes auf die Gentransfereffizienz von transMAG ^{PEI} /DNA-Komplexen.....	56
3.2 Die Rolle der Caveolae für die Aufnahme bzw. den intrazellulären Transport von synthetischen Genvektorkomplexen.....	57
3.2.1 Einfluss von Caveolae-Inhibitoren auf die Gentransfereffizienz <i>in vitro</i>	57
3.2.2 Untersuchungen zur Kolo-kalisation der Genvektorkomplexe mit Caveolae <i>in vitro</i>	57
3.2.3 Untersuchungen zur Kolo-kalisation der Genvektorkomplexe mit Caveolae <i>in vivo</i>	62
3.3 Der nukleäre Import von DNA unter Verwendung synthetischer Genvektoren in einem zellfreien System.....	64
3.3.1 Intaktheit und Funktionalität isolierter Zellkerne.....	64
3.3.2 Erzielte Gentransfereffizienzen im zellfreien System.....	68
3.3.3 Die Notwendigkeit der SV40-Sequenz für die Effizienz der Aufnahme von Plasmid DNA unter Verwendung isolierter Zellkerne.....	72
3.3.4 Lokalisierung von PEI und DNA unter Verwendung des zellfreien Systems	73
3.3.5 Einfluss der im Zelllysate enthaltenen Komponenten auf die Dissoziation der Genvektorkomplexe	75
3.3.6 Die Rolle der zytosolischen RNA für die Dissoziation der Genvektorkomplexe.....	76

3.3.7 Vergleich der mit verschiedenen synthetischen Genvektorkomplexen erzielten Gentransfereffizienzen <i>in vitro</i> mit der Stabilität dieser Genvektorkomplexe	80
4. DISKUSSION.....	82
4.1 Einblicke in den Mechanismus der zellulären DNA-Aufnahme mittels Magnetofektion.....	82
4.2 Die Rolle der Caveolae für die Aufnahme bzw. den intrazellulären Transport synthetischer Genvektorkomplexe.....	86
4.3 Zytosolische RNA als Voraussetzung für die Dissoziation synthetischer Genvektorkomplexe und erfolgreichen Gentransfer	88
4.4 Postulierter Mechanismus der zellulären Aufnahme, des intrazellulären Transports und der zytosolischen Dissoziation synthetischer Genvektorkomplexe	92
5. ZUSAMMENFASSUNG	94
6. LITERATUR	96

Anhang: Bezugsliste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

1. Einleitung

1.1 Die somatische Gentherapie – Grundlagen und Perspektiven

1.1.1 Grundlagen

Die somatische Gentherapie ist eine neuartige therapeutische Strategie zur Behandlung angeborener und erworbener Erkrankungen. Das ihr zu Grunde liegende Prinzip ist das gezielte Einschleusen einer intakten Kopie des für die entsprechende Krankheit verantwortlichen defekten Gens in die erkrankten Körperzellen. Dort soll das intakte Gen die Funktion des defekten Gens komplementieren. Die Gentherapie hätte so gegenüber konventionellen Therapieformen den Vorteil die entsprechende Erkrankung kausal zu therapieren (Rosenecker, 2004).

Diese Form der Gentherapie ist von der Keimbahngentherapie abzugrenzen. Hier sollen Keimzellen gentherapeutisch verändert werden, mit dem Ziel, Erbdefekte vor ihrer Entstehung im Individuum zu verhindern. Der Eingriff in die menschliche Keimbahn ist jedoch nach dem deutschen Embryonenschutzgesetz vom 1. Januar 1991 verboten.

Durch die vollständige Entschlüsselung des menschlichen Genoms im Jahre 2003 wurde es möglich weitere Gene zu identifizieren, deren Fehlfunktion zur Ausprägung von Erkrankungen führen. Diese neuen Erkenntnisse über die molekularen Ursachen von Erkrankungen eröffnen viele neue Einsatzmöglichkeiten für die somatische Gentherapie. Neben monogenen Erbkrankheiten, z.B. der Zystischen Fibrose, gibt es mittlerweile Gentherapiestudien zu erworbenen Erkrankungen wie Krebs, kardiovaskulären Erkrankungen und Infektionskrankheiten (Edelstein *et al.*, 2004).

Als genetisches Material können dabei DNA, RNA oder künstliche Chromosomen (YACs, „yeast artificial chromosomes“; BACs, „bacterial artificial chromosomes“; HACs, „human artificial chromosomes“), aber auch anti-sense Oligonukleotide oder siRNA dienen. Letztere werden dazu benutzt, pathogene Genprodukte in ihrer Entstehung zu verhindern (Caplen, 2004).

Bezüglich des Einbringens genetischen Materials in den Patienten, unterscheidet man bei der somatischen Gentherapie zwischen zwei Strategien. Für die *ex vivo*-Gentherapie werden patienteneigene Zellen (z.B. Lymphozyten oder hämatopoetische Stammzellen) außerhalb des

Körpers gentherapeutisch verändert, und diese korrigierten Zellen dann in den Körper reinfundiert. Die *in vivo*-Gentherapie basiert auf der direkten Applikation von Vektoren, die das entsprechende Gen enthalten (Rosenecker, 2004).

Die Möglichkeiten der Gentherapie sind vielfältig. Der einfachste Ansatz ist der des Einschleusens definierter DNA-Sequenzen in die erkrankten Zellen eines Patienten, um die Fehlfunktion eines defekten Gens zu ersetzen. Es können aber auch solche DNA-Sequenzen eingeschleust werden, die der Zelle eine neue Funktion verleihen. Die Zelle ist dann in der Lage ein bestimmtes Protein zu produzieren, welches eine therapeutische Funktion hat. Des Weiteren bietet die Gentherapie viele Behandlungsmöglichkeiten bei Krebserkrankungen:

In der Tumorthherapie kann sie beispielsweise genutzt werden, um entartete Zellen zum Absterben zu bringen. Dies kann durch Applikation von Tumorsuppressorgenen (z.B. *p53*) oder Intensivierung der anti-Tumor Immunantwort (z.B. durch Vakzinierung mit modifizierten Tumorzellen, die immunstimulierende Moleküle exprimieren) geschehen. Eine weitere Möglichkeit Tumorzellen dem Zelltod zuzuführen ist die „Gene-directed enzyme prodrug therapy“ (GDEPT) auch „Suizidgentherapie“ genannt. Hierbei werden DNA-Sequenzen eingeschleust, die für Enzyme kodieren, welche Vorläufermoleküle, so genannte „Prodrugs“, in zytotoxische Substanzen umwandeln können. Die nicht toxischen „Prodrugs“ können, ohne eine Gefahr für den Patienten darzustellen, in hohen Dosen verabreicht werden. Sie werden *in situ* von den gentherapeutisch behandelten Zellen in die zytotoxische Substanz umgewandelt. In klinischen Studien wurden bereits verschiedene GDEPT-Systeme benutzt. Das meist verwendete basiert auf der Umwandlung des nicht toxischen „Prodrugs“ Ganciclovir in das zytotoxische Triphosphat-Ganciclovir mittels der Herpes Simplex Virus (HSV)-Thymidin Kinase (Edelstein *et al.*, 2004).

1.1.2 Genvektoren

Für den Gentransfer, dem Einschleusen der DNA-Sequenzen in die Körperzellen, wird zwischen viralen und nicht-viralen Genvektorsystemen unterschieden. Entscheidend für den Erfolg der somatischen Gentherapie ist der Transport des genetischen Materials in die Zielzelle und weiter in den Zellkern, so dass Transkription, Translation und Proteinbiosynthese stattfinden können. Die „Verpackung“ der DNA ist wichtig, da die negative Ladung sog. „nackter“ DNA den Eintritt in die Zelle behindert. Außerdem wird

nackte DNA leichter durch Nukleasen abgebaut. Die Effizienz dieser Behandlungsmethode hängt daher wesentlich von den verwendeten Genvektoren ab.

Als Genvektoren (=Vektoren) werden im Folgenden die für die DNA verwendeten „Transportvehikel“ bezeichnet. Die Komplexe aus Genvektor und DNA werden Genvektorkomplexe genannt.

In der viralen Gentherapie nutzt man für den Gentransfer die Fähigkeit von Viren Zellen zu infizieren und DNA einzuschleusen. Durch rekombinante Techniken werden Viren so verändert, dass sie zwar noch in der Lage sind an Wirtszellen zu binden und die DNA einzuschleusen, aber ihre Pathogenität und Replikationseigenschaften verloren haben. Dennoch ist der größte Nachteil der viralen Genvektorsysteme ihre große Immunogenität (siehe 1.1.3 Klinische Studien). Da sich die vorliegende Arbeit mit nicht-viralen Genvektorsystemen beschäftigt, soll hier auf die viralen Vektoren nur kurz eingegangen werden.

Retrovirale Vektoren (z.B. Abkömmlinge von murinen Retroviren) waren die ersten Vektoren, die in der Gentherapie genutzt wurden. Sie sind auch heute noch die am häufigsten verwendeten Vektoren. Retroviren haben eine relativ limitierte Kapazität für einzuschleusende DNA-Sequenzen (ca. 8 kb), gelangen aber mit einer hohen Effizienz in sich teilende Zellen. Durch ihre Integration in die Chromosomen der Zielzellen, führen sie zu einem stabilen Gentransfer. Dies stellt jedoch gleichzeitig ein hohes Risiko dar, weil diese Integration in der Nähe von Protoonkogenen stattfinden, und so zur Onkogenese führen kann (siehe 1.1.3 Klinische Studien).

Adenoviren sind die am zweithäufigsten in klinischen Studien verwendeten Vektoren. Man kennt 42 verschiedene Serotypen von Adenoviren, von denen bekannt ist, dass sie den Menschen infizieren können. Typischerweise werden für Gentherapiestudien Serotyp 5 Adenoviren benutzt, bei denen die Mehrheit der Regionen E1a und E1b deletiert wurde. Die Regionen E1a und E1b werden auch als sog. frühe Gene bezeichnet, da sie früh nach Infektion der Zelle aktiviert werden. Sie starten die Transkription von Genen, die zur Replikation des Virengensoms benötigt werden. Die Adenoviren können verglichen mit den Retroviren größere DNA-Fragmente beherbergen (ca. 20 kb); dennoch ist ihre Kapazität zu gering, um sie als Genvektoren für alle vorstellbaren klinischen Applikationen zu verwenden. Die Vorteile der Adenoviren liegen in ihrer hohen Gentransfereffizienz, die jedoch nur transient ist, und ihrer Fähigkeit auch sich nicht teilende Zellen zu infizieren. Der Nachteil der

Adenoviren liegt in ihrer hohen Immunogenität (siehe 1.1.3 Klinische Studien) (Edelstein *et al.*, 2004).

Die Limitierungen bei der Verwendung viraler Vektoren, vor allem die relativ geringe Kapazität für therapeutische DNA-Sequenzen und Bedenken bezüglich ihrer Sicherheit haben zur Entwicklung synthetischer (nicht-viraler) Genvektoren geführt, auf die im Kapitel 1.2 „Synthetische (nicht-virale) Genvektorsysteme“ ausführlich eingegangen wird.

1.1.3 Klinische Studien

Die erste klinische Gentherapiestudie am Menschen fand 1989 statt. In dieser Studie wurde ein Retrovirus benutzt um ein bakterielles Gen, das für die Neomycinresistenz kodiert, in Tumor infiltrierende Lymphozyten einzuschleusen. Das Neomycinresistenzgen wurde als Marker für die transfizierten Zellen benutzt. Die Verteilung und das Überleben der Lymphozyten *in vivo* sollte so untersucht werden. Die modifizierten Lymphozyten wurden in Patienten reinfundiert, die an einem Melanom, das bereits Metastasen ausbildete, erkrankt waren. Isolierte Zellen von vier der fünf Patienten wuchsen erfolgreich auf G418, einem Neomycin-Analogon, das normalerweise toxisch für eukaryotische Zellen ist. Bei etwa der Hälfte der behandelten Patienten ging das Tumorwachstum zurück (Rosenberg *et al.*, 1990). Seither wurden weltweit in mehr als 900 klinischen Gentherapiestudien über 3 400 Patienten in 24 verschiedenen Ländern behandelt. Zweidrittel dieser Studien fanden in den USA statt, gefolgt von Großbritannien und Deutschland. Als Indikation für die klinischen Gentherapiestudien steht Krebs an erster Stelle (66 %), gefolgt von vererbten monogenen (9,8 %) und kardiovaskulären Erkrankungen (8,3 %). Die überwiegende Mehrheit der klinischen Gentherapiestudien (84 %) befindet sich noch in der klinischen Phase I oder I/II. In ca. 70 % der klinischen Gentherapiestudien wurden Viren als Vektoren eingesetzt. Insgesamt wurden als Vektoren in 28 % aller klinischen Studien Retroviren und in 26 % Adenoviren verwendet. Nackte Plasmid DNA und andere nicht-virale Genvektoren wurden in 25 % aller klinischen Studien eingesetzt (Edelstein *et al.*, 2004).

Die wohl bekanntesten klinischen Gentherapiestudien sind die zu den schweren kombinierten Immundefekterkrankungen Adenosindeaminase (ADA)-Mangel, Ornithin-Transcarbamylase (OTC)-Mangel, und dem angeborenen schweren X-chromosomalen kombinierten Immundefekt SCID-X1:

Im Jahr 1990 therapierten amerikanische Wissenschaftler die damals vierjährige Ashanti DeSilva, die an einem angeborenen ADA-Mangel litt (Blaese *et al.*, 1995). ADA ist verantwortlich für den Abbau toxischer Metabolite des Purinstoffwechsels. Der ADA-Mangel führt zu einer Akkumulation von Deoxyadenosin, das u. a. eine direkte toxische Schädigung der T-Lymphozyten verursacht. In der Folge kommt es zu einer lebensbedrohlichen Immunschwäche. In der durchgeführten Studie wurden T-Lymphozyten mit retroviralen Genvektoren, die die cDNA für ADA enthielten, *ex vivo* transfiziert und der Patientin reinfundiert. Es kam zu einer körpereigenen Expression von ADA, die allerdings nicht hoch genug war um auf eine begleitende Substitutionstherapie mit Polyethylenglykol (PEG)-ADA ganz zu verzichten.

Einen schweren Rückschlag erlebte die Gentherapie im Jahr 1999 in den USA. Der 18-jährige Jesse Gelsinger, der an einem OTC-Mangel litt, starb infolge einer Gentherapie an einer unerwartet starken inflammatorischen Reaktion gegen die als Vektoren verwendeten Adenoviren. Das abgeschwächte Adenovirus enthielt die cDNA für OTC und wurde dem Patienten in die rechte hepatische Arterie infundiert (Raper *et al.*, 2003). Die klinische Studie wurde daraufhin abgebrochen (Edelstein *et al.*, 2004).

Erste Erfolge einer Gentherapie des SCID-X1 konnte die Gruppe um Alain Fischer in Paris im Jahr 2000 verzeichnen. Diese Immunschwäche ist durch eine Blockade in der Ausdifferenzierung zu T- und „Natural Killer“ (NK)-Lymphozyten gekennzeichnet. Diese Blockade wird hervorgerufen durch Mutationen des Gens, das für eine Untereinheit von Zytokin-Rezeptoren, die so genannte γ -c-Kette kodiert (Interleukin-2, -4, -7, -9 und -15 Rezeptoren) (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2000). Das defekte X-chromosomal lokalisierte Gen konnte *ex vivo* in einer Kultur von zuvor den Patienten entnommenen Knochenmarkszellen durch viralen Gentransfer komplementiert werden. Die transformierten Zellen wurden anschließend den Patienten retransplantiert und reiften im Körper zu korrekt funktionierenden Immunzellen heran. Die genetisch korrigierten Zellen haben einen Selektionsvorteil gegenüber den unbehandelten Vorläuferzellen in der T-Zell-Differenzierung. Als Genvektor verwendete man ein gentechnisch verändertes Moloney Retrovirus, das das korrekte γ -c-Gen trug. Zu einem Rückschlag für diese Gentherapiestudie kam es Ende des Jahres 2002, als zwei der zehn behandelten Kinder eine Leukämie entwickelten (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003a), die auf die Integration der Retroviren in die Nähe des LMO2 Protoonkogen Promotors zurückgeführt wird (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003b). Mittlerweile hat ein drittes Kind aus dieser Studie Leukämie entwickelt (Check, 2005).

Die Rückschläge der beiden letztgenannten Studien führten zu einem allgemeinen Rückgang klinischer Gentherapiestudien (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2004; Edelstein *et al.*, 2004).

1.1.4 Zukunftsaussichten

Die größte Hürde für die Gentherapie auf dem Weg zu einer anerkannten etablierten Therapieform stellen derzeit die noch nicht ausgereiften Genvektorsysteme dar. Die Gentransfereffizienz ist momentan noch gering, so dass hohe Dosen der Vektoren benötigt werden. Dies stellt insbesondere ein Problem bei der Verwendung viraler Systeme dar. Durch hohe Dosen können vermehrt entzündliche Reaktionen entstehen. Außerdem kann die Antikörperbildung gegen virale Vektoren eine wiederholte Anwendung verhindern. Nicht zu vergessen sind die bereits erwähnten genotoxischen (erbgutverändernden) Risiken.

Trotz aller Rückschläge hat die Gentherapie prinzipiell das Potential bei klinischen Fragestellungen, für die eine konventionelle Therapie nicht existiert (z.B. bei bestimmten Krebserkrankungen) bzw. nicht zufrieden stellend ist (z.B. haplo-identische hämatopoetische Stammzelltransplantationen bei schweren Immundefekterkrankungen), zu einer etablierten Behandlungsmethode heranzureifen (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2004).

Die somatische Gentherapie ist auch weiterhin eine viel versprechende Therapie bei monogenen Erbkrankheiten für die es keine andere Möglichkeit zur Heilung gibt wie beispielsweise der Zystischen Fibrose (CF, Mukoviszidose) (Griesenbach *et al.*, 2004), Rosenecker und Rudolph, 2001, Rosenecker, 2004).

Die Ursache für diese Krankheit liegt in der Mutation des *CFTR*-Gens, das für den „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“ (CFTR) kodiert. Dabei handelt es sich um einen Transportkanal für Chlorid-Ionen, der auf der Oberfläche von Epithelzellen in der Lunge und anderen Organen zu finden ist. Man kennt mittlerweile mehr als Tausend verschiedener Mutationen, die alle zu einem Defekt im Ionentransport führen. Dieser Defekt führt zur Ausbildung eines zähen Schleims, der die mukoziliäre Clearance behindert, und das Einnisten von Bakterien (v.a. *Pseudomonas aeruginosa*) begünstigt. Trotz des Fortschritts in der konventionellen Behandlung dieser Krankheit konnten Lebensqualität und Lebenserwartung nicht wesentlich verbessert werden. Die Lebenserwartung der Patienten ist nicht viel höher als 30 Jahre (Reinhardt, 2001).

Die Lokalisierung und Klonierung des *CFTR*-Gens im Jahre 1989 (Riordan *et al.*, 1989) machte die Gentherapie der CF überhaupt erst möglich. In Zellkulturmodellen konnte der Nachweis erbracht werden, dass der Gentransfer des intakten *CFTR*-Gens in CF-defekte Zellen zu einer funktionellen Korrektur führt. Daraufhin konnte in Tiermodellen gezeigt werden, dass das *CFTR*-Gen erfolgreich in das respiratorische Epithel eingeschleust werden kann und nachfolgend eine Korrektur der für CF charakteristischen Chloridionensekretionsstörung erfolgte. Seit 1993 fanden 29 Gentherapiestudien zu CF statt. Dennoch konnte ein lang andauernder therapeutischer Nutzen bisher nicht gezeigt werden. Insbesondere das Erreichen der Zielzellen in der Lunge stellt ein Problem dar (Ferrari *et al.*, 2002; Griesenbach *et al.*, 2004). Die zukünftige Forschung muss sich daher auf die Entwicklung effizienterer Genvektoren, einer höheren Gentransferrate und länger andauernder Genexpression richten (Rosenecker und Rudolph, 2001).

Ein idealer Genvektor sollte folgende Eigenschaften besitzen (Rosenecker, 2004):

- geringe Toxizität, bzw. keine Pathogenität
- geringe Immunogenität
- hohe Gentransfereffizienz
- hohe Selektivität für die Zielzellen
- lang andauernde Genexpression
- große Kapazität für das Transgen

Nur durch intensive Grundlagenforschung wird die Gentherapie den Status einer etablierten, routinemäßig einsetzbaren Behandlungsmethode erreichen können.

1.2 Synthetische (nicht-virale) Genvektorsysteme

Synthetische Genvektorsysteme zeigen verglichen mit viralen eine wesentlich niedrigere Gentransfereffizienz, haben aber den entscheidenden Vorteil nicht immunogen zu sein.

Das einfachste und sicherste nicht-virale Genvektorsystem stellt die Verwendung „nackter“ Plasmid DNA dar, die direkt in das entsprechende Gewebe, z. B. Muskeln, injiziert wird (Wolff *et al.*, 1990). Diese Methode führt zu signifikanter Genexpression, und wird in 14 %

aller klinischen Studien eingesetzt (Edelstein *et al.*, 2004). Der Nachteil dieser Methode ist der Abbau der DNA durch Nukleasen.

Um die Gentransfereffizienz „nackter“ Plasmid DNA zu steigern wird der Gentransfer häufig mit physikalischen Methoden kombiniert (Niidome and Huang, 2002). Beispiele hierfür sind die Elektroporation, die „Gene Gun“-Methode und die Anwendung von Ultraschall oder hydrodynamischen Drucks:

Die Elektroporation führt durch kurze elektrische Impulse zu einer Permeabilisierung der Zellmembranen. Sie wird beispielsweise *in vivo* angewandt um die Aufnahme von DNA nach deren Injektion zu steigern (Somari *et al.*, 2000). Drabick und Kollegen etablierten am Beispiel von Hepatitis B eine kutane Transfektionsmethode in Kombination mit der Elektroporation zur DNA-Vakzinierung (Drabick *et al.*, 2001). Mit Hilfe der „Gene Gun“-Methode kann DNA direkt in Gewebe oder Zellen transferiert werden. Indem man Zellen mit Goldpartikeln, die mit einer DNA-Schicht umhüllt sind, „beschießt“, erreicht man eine direkte Penetration der Zellen durch die Zellmembran ins Zytoplasma und sogar in den Zellkern. Hierbei umgeht man die Endosomen. Diese Methode wurde ebenfalls zur kutanen Transfektion als DNA-Vakzinierungsstrategie verwendet (Lin *et al.*, 2000). Die Anwendung von Ultraschall führt ähnlich wie bei der Elektroporation zu einer Permeabilisierung der Zellen. Sie wird beispielsweise für den Gentransfer in Muskeln angewandt (Song *et al.*, 2002). Die hydrodynamische Injektion wird bei Mäusen eingesetzt. Sie beruht auf der schnellen Injektion großer Volumina an Plasmid DNA in die Schwanzvene. Diese Art der Injektion führt zu einer hohen Genexpression, insbesondere in der Leber (Budker *et al.*, 2000).

Dem Gentransfer „nackter“ Plasmid DNA steht der Gentransfer vermittelt von einem „Carrier“ wie kationischen Lipiden (Felgner *et al.*, 1987) bzw. kationischen Polymeren (Boussif *et al.*, 1995; Wu and Wu, 1987) gegenüber (Elouahabi and Ruyschaert, 2005; Niidome and Huang, 2002). Diese Vektoren weisen unter physiologischen Bedingungen zumeist eine positive Ladung auf und können so über elektrostatische Anziehungskräfte die unter physiologischen Bedingungen negativ geladene DNA komplexieren. Man bezeichnet auf Lipiden basierende Genvektorkomplexe auch als Lipoplexe, solche die auf Polymeren basieren auch als Polyplexe.

Als neueste Methode zur Komplexierung von DNA wird derzeit die Verwendung von Nanopartikeln untersucht. Die wichtigsten Vertreter sind Formulierungen von so genannten „Solid Lipid Nanoparticles“ (SLN) (Olbrich *et al.*, 2001; Rudolph *et al.*, 2004). Die

resultierenden SLN/DNA-Komplexe werden auch als Nanoplexe bezeichnet. Sie zeichnen sich insbesondere durch ihre geringe Toxizität aus.

Des Weiteren existieren zahlreiche Modifikationen der bestehenden Genvektoren. Es gibt beispielsweise einige anionische pH-sensitive Peptide (Turk *et al.*, 2002) und kationische fusogene Peptide (Lee *et al.*, 2001), die zu einer Steigerung des Gentransfers führen. Diese Substanzen können unter schwach sauren Bedingungen, wie sie in Endosomen vorherrschen, Membranen zerstören. Dies führt zu einer gesteigerten Freisetzung der DNA in das Zytosol (siehe 1.3 Aufnahme und intrazellulärer Transport synthetischer Genvektorkomplexe). Außerdem werden häufig Kernlokalisierungssignale (NLS) eingesetzt um einen aktiven Transport der DNA in den Zellkern zu erreichen (Bremner *et al.*, 2001; Cartier and Reszka, 2002; Tachibana *et al.*, 2001). In den meisten Fällen wird das NLS an einen „Carrier“ wie kationische Polymere oder direkt an die DNA gekoppelt. Um die Aufnahme der Genvektorkomplexe in die Zelle zu steigern wurde die Methode des Rezeptor-vermittelten Gentransfers entwickelt. Der Genvektorkomplex ist dabei an einen Liganden gekoppelt, der an bestimmte Rezeptoren der Zielzellen bindet. Diese Rezeptoren vermitteln die spezifische Aufnahme der DNA in die Zelle (Wu and Wu, 1987). Bei einer sehr erfolgreichen Strategie wurde als Ligand Transferrin kovalent an die kationischen Polymere Poly-L-Lysin (PLL) (Kircheis *et al.*, 1997) bzw. Polyethylenimin (PEI) (Ogris *et al.*, 2001) gebunden.

Die Anwendung nicht-viraler Genvektoren führt zu einer weniger starken Immunantwort als bei der Verwendung von Viren als Vektoren. Dennoch werden auch diese Genvektorkomplexe von Makrophagen, dendritischen Zellen und anderen Zellen des Immunsystems erkannt. Im Wesentlichen können unmethylierte CpG Motive der Plasmid DNA Inflammation auslösen. Durch Eliminierung der CpG Motive bzw. deren Reduktion in der Plasmid DNA konnte die Immunantwort reduziert werden (Hofman *et al.*, 2001; Yew *et al.*, 2000). Das Problem der kurzzeitigen Genexpression und des Erreichens der Zielzellen („targeting“) soll durch die Konstruktion Gewebe-spezifischer, sich selbst-replizierender oder kontrolliert integrierender Plasmid Expressionssysteme gelöst werden (Niidome and Huang, 2002).

Ein neuer Ansatzpunkt um Genvektoren sicherer zu machen und die Dauer der Genexpression zu erhöhen ist die sequenzspezifische Vektor Insertion in das Genom. Hier gibt es die Möglichkeit den Vektor beispielsweise über eine Integrase in einen nicht kodierenden Bereich inserieren zu lassen. Dies kann mit Hilfe der Phagenintegrase phiC31 geschehen, die zusammen mit einem Plasmid, welches für das entsprechende Transgen und eine kurze

Erkennungssequenz kodiert, in die Zielzelle eingeschleust wird. Die phiC31 Integrase führt zu einer Paarung der Erkennungssequenz mit endogenen genomischen Sequenzen und führt so zu einer stabilen genomischen Integration des Plasmids (Groth *et al.*, 2000; Thyagarajan *et al.*, 2001). Um entsprechende nicht kodierende Bereiche des Genoms zu finden ist die inzwischen vollendete Entschlüsselung des menschlichen Genoms auch hier von elementarer Bedeutung.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht das kationische Polymer PEI, das in einer verzweigten und einer linearen Form existiert, im Folgenden B-PEI bzw. L-PEI genannt. Abbildung 1 zeigt die Strukturformel von PEI.

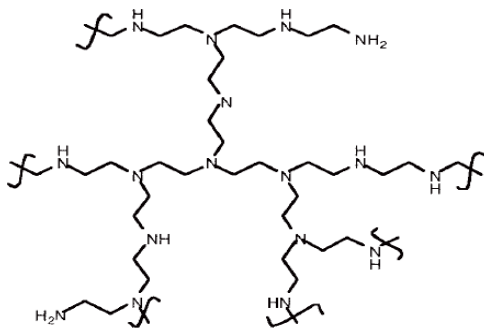


Abb. 1: **Strukturformel des kationischen Polymers PEI in seiner verzweigten Form** (Rosenecker und Rudolph, 2001).

Unter den synthetischen Genvektoren zeigt PEI viel versprechende Gentransfereffizienzen *in vitro* und *in vivo* (Kircheis *et al.*, 2001). Durch die sich wiederholenden Ethylamin Einheiten ist das Polymer gut wasserlöslich. Eine weitere wichtige Eigenschaft von PEI ist seine hohe kationische Ladungsdichte. Sie beruht darauf, dass jedes dritte Atom im Molekül ein potentiell protonierbares Stickstoffatom ist. Bei einem physiologischen pH-Wert ist ungefähr jedes fünfte oder sechste Stickstoffatom protoniert (Kircheis *et al.*, 2001). Die Bindung zwischen PEI und DNA erfolgt durch elektrostatische Anziehung, die zu einer spontanen Anlagerung und der Bildung von Partikeln im Nanometerbereich führt. Durch das Binden der DNA an PEI wird das Protonierungsprofil von PEI leicht verändert. Trotzdem wird nur etwa jedes zweite bis dritte Stickstoffatom bei physiologischem pH-Wert protoniert. PEI hat eine hohe Pufferkapazität über ein breites pH-Spektrum hinweg (Boussif *et al.*, 1995; Tang and

Szoka, 1997). Daraus resultiert die intrinsische Fähigkeit zur Freisetzung aus den Endosomen (siehe 1.3 Aufnahme und intrazellulärer Transport synthetischer Genvektorkomplexe).

Der PEI-vermittelte Gentransfer ist abhängig von dem Verhältnis von PEI-Stickstoff zu DNA-Phosphat (N/P). Dieses Verhältnis darf nicht zu niedrig gewählt werden, da die entstehenden Komplexe sonst neutral sind und aggregieren (Kircheis *et al.*, 2001). Vom N/P-Verhältnis sind Partikelparameter abhängig, wie Größe und Oberflächenpotential, die Einfluss auf die Transfektionseffizienz haben (Choosakoonkriang *et al.*, 2003).

L-PEI und B-PEI verhalten sich *in vitro* und *in vivo* unterschiedlich (Wightman *et al.*, 2001). Hohe Reportergenexpression konnte nach systemischer Applikation vor allem von auf L-PEI basierenden Genvektorkomplexen *in vivo* gezeigt werden. Auch die Toxizitätsprofile nach systemischer Applikation sprechen für L-PEI (Goula *et al.*, 1998a).

1.3 Aufnahme und intrazellulärer Transport synthetischer Genvektorkomplexe

Das Einschleusen der Genvektorkomplexe in Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Auf zellulärer Ebene lässt sich die Transfektion in vier Hauptschritte unterteilen. Erstens der Zellbindung, zweitens der Internalisierung, drittens der intrazellulären Freisetzung und viertens dem Kerntransport (Elouahabi and Ruyschaert, 2005).

Für Polyplexe ist ein endozytotischer Aufnahmemechanismus gezeigt worden, der wahrscheinlich über Heparansulfat-Proteoglykan-Rezeptoren bzw. Syndekane vermittelt wird (Kopatz *et al.*, 2004; Mislick and Baldeschwieler, 1996). Nach Bindung der Polyplexe an die Heparansulfat-Proteoglykan-Rezeptoren folgt die zelluläre Internalisierung mit Hilfe von Aktinfilamenten durch Ausbildung von endozytotischen Vesikeln (Durrbach *et al.*, 1996; Kopatz *et al.*, 2004). Die Polyplexe werden dem Weg der Endozytose folgend von den Endosomen, mit Hilfe von Mikrotubuli (Durrbach *et al.*, 1996; Suh *et al.*, 2003), in die Lysosomen transportiert, wo sie abgebaut werden. Anschließend müssen die Polyplexe aus den Endo- bzw. Lysosomen freigesetzt werden, damit die DNA in den Zellkern transportiert werden kann. Für Polykationen wie PLL stellt dieser Schritt eine wesentliche Barriere dar, weil ihre Freisetzung aus dem endolysosomalen Kompartiment gering ist. Nur durch Zugabe endosomolytischer Substanzen wie Chloroquin und Glycerol kann die Gentransfereffizienz gesteigert werden (Kircheis *et al.*, 2001). PEI hingegen ist aufgrund seiner hohen Pufferkapazität in der Lage die endosomale Membran zu destabilisieren und induziert so

selbst Endosomolyse. Es besitzt eine intrinsische endosomolytische Aktivität. PEI induziert aufgrund der hohen Pufferkapazität eine massive Akkumulation von Protonen in den Endosomen, gefolgt von einem passiven Einströmen von Chlorid-Ionen und Wasser. Dies führt zu einem osmotischen Anschwellen der Endosomen und resultiert schließlich durch deren Platzen in der Freisetzung der Genvektorkomplexe in das Zytoplasma. Dies ist die Voraussetzung dafür, dass die DNA in den Zellkern gelangen kann, wo sie epichromosomal verbleibt. Dieser Effekt wird als „Protonenschwammeffekt“ bezeichnet. (Bieber *et al.*, 2002; Boussif *et al.*, 1995; Merdan *et al.*, 2002; Sonawane *et al.*, 2003). Abbildung 2 zeigt eine schematische Darstellung des Prinzips der Aufnahme und des intrazellulären Transports synthetischer Genvektorkomplexe.

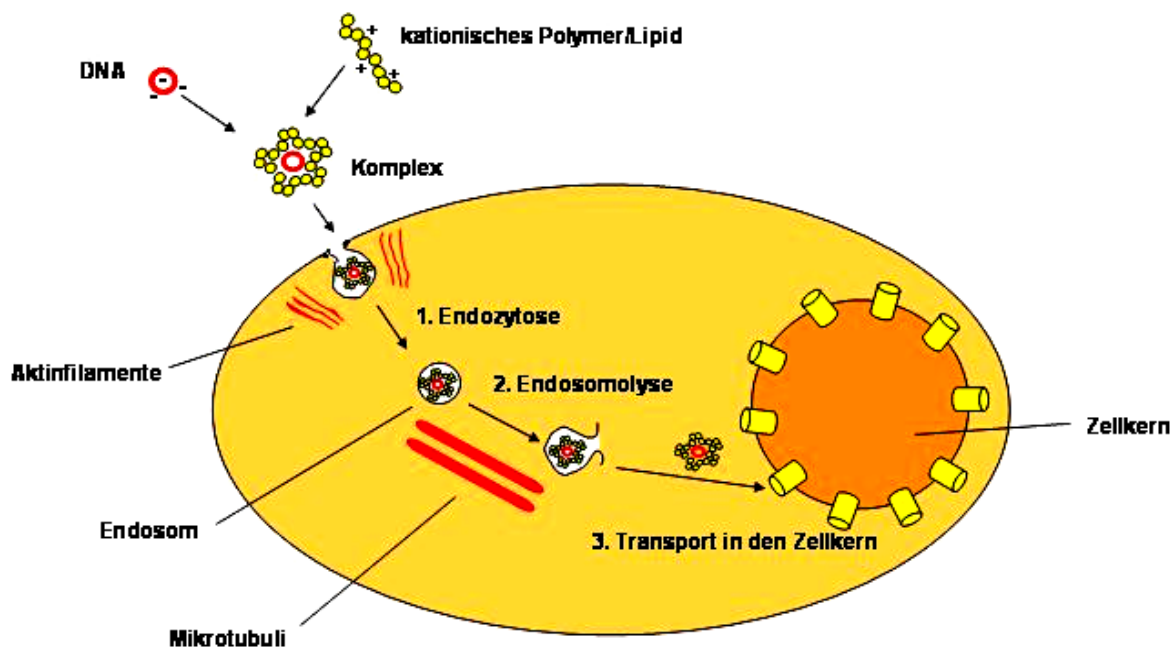


Abbildung 2: Schematische Darstellung des nicht-viralen Gentransfers.

1.3.1 Endozytose als Aufnahmemechanismus

Die Endozytose ist an verschiedensten zellulären Prozessen, wie der Weiterleitung neuronaler, metabolischer und proliferativer Signale, der Aufnahme vieler essentieller Nährstoffe und der Fähigkeit zur Abwehr eindringender Mikroorganismen, beteiligt (Mellman, 1996). Sie ist charakterisiert durch die Ausbildung von Membranvesikeln an der Plasmamembran. Man unterscheidet Clathrin-abhängige und Clathrin-unabhängige Endozytose. Die Clathrin-abhängige Endozytose ist die bisher am besten charakterisierte. Die hierbei entstehenden Vesikel, die so genannten „clathrin coated pits“ sind mit einem Mantel

bestehend aus dem Protein Clathrin umgeben und haben einen Durchmesser von ca. 100 nm (Mellman, 1996; Nichols and Lippincott-Schwartz, 2001). Nach der Internalisierung der Vesikel fusionieren diese mit Endosomen. Dort finden das „molekulare Sorting“ mittels der Mikrotubuli und die Dissoziation von potentiellen Rezeptoren statt. Der Mantel aus Clathrin wird wiederverwertet. Als nächster Schritt folgt die Degradation in den Lysosmen bzw. der Transport zum eigentlichen Ziel (Mellman, 1996). Bekannte Beispiele für den Clathrin-abhängigen Aufnahmemechanismus von Rezeptor gebundenen Liganden sind Transferrin und das low-density Lipoprotein (LDL) (Mellman, 1996). Zu den Clathrin-unabhängigen Endozytosewegen zählen die Phagozytose, die Makropinozytose, die Caveolae-vermittelte Aufnahme und ein konstitutiver nicht Clathrin-vermittelter Aufnahmemechanismus (Nichols and Lippincott-Schwartz, 2001) (siehe Abb. 3). Von Phagozytose spricht man nur in Zusammenhang mit Makrophagen. Unter Makropinozytose versteht man die Aufnahme von Substanzen über große irreguläre Vesikel (Nichols and Lippincott-Schwartz, 2001).

1.3.2 Import über Caveolae – ein alternativer Aufnahmemechanismus

Die Caveolae-vermittelte Aufnahme ist durch Vesikel charakterisiert, die Omega-förmig sind und keinen „Mantel“ besitzen. Aufgrund ihrer charakteristischen Form wurden sie erstmals unter dem Elektronenmikroskop entdeckt (Yamada, 1955). Sie haben einen Durchmesser von ca. 50-100 nm und kommen in vielen Zelltypen, v.a. in Endothelzellen und Typ I Pneumozyten vor (Gumbleton *et al.*, 2000). Die Caveolae bestehen aus Caveolin (Caveolin-1, -2 und -3), einem Protein das zur Familie der Cholesterol-bindenden Proteine gehört. Neben Caveolin sind die Caveolae reich an Cholesterol, Sphingomyelin und Glycosphingolipide (Anderson, 1998; Gumbleton *et al.*, 2000). Ursprünglich wurden die Caveolae über ihre Fähigkeit Moleküle durch Endothelzellen hinweg zu transportieren charakterisiert (Anderson, 1998). Heute ist von den Caveolae bekannt, dass sie für die Transzytose (d. h. dem Transport von einem extrazellulären Raum zum anderen) zuständig sind und u.a. eine Rolle in der Signalweiterleitung spielen. Bestimmte Viren, z.B. das SV 40-Virus, gelangen über Caveolae in Zellen (Carver and Schnitzer, 2003; Parton, 2003). Die verschiedenen in einer Zelle existierenden Endozytosewege zeigt Abbildung 3.

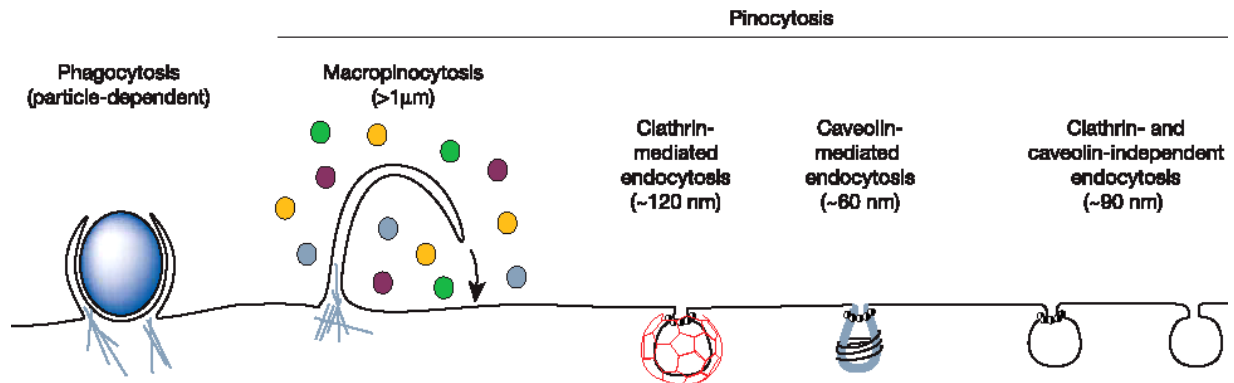


Abbildung 3: **Wege der zellulären Aufnahme** (Conner and Schmid, 2003).

1.4 Die Methode der Magnetofektion

Die Methode der Magnetofektion stellt eine Sonderform der Transfektion dar. Sie wurde entwickelt um die Gentransfereffizienz zu steigern und den zielgerichteten Gentransfer (z. B. um *in vivo* Tumore oder bestimmte Organe zu erreichen) zu ermöglichen (Plank *et al.*, 2003a; Scherer *et al.*, 2002).

Die Magnetofektion beruht auf der Komplexbildung von DNA mit superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln. Sie ist sowohl auf virale, als auch auf nicht-virale Systeme anwendbar (Scherer *et al.*, 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde ein nicht-virales System verwendet. Dazu wurden superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel, die mit PEI beschichtet wurden, eingesetzt. Der Gentransfer wird bei der Magnetofektion über ein Magnetfeld vermittelt. Das Prinzip der Magnetofektion ist schematisch in Abbildung 4 dargestellt.

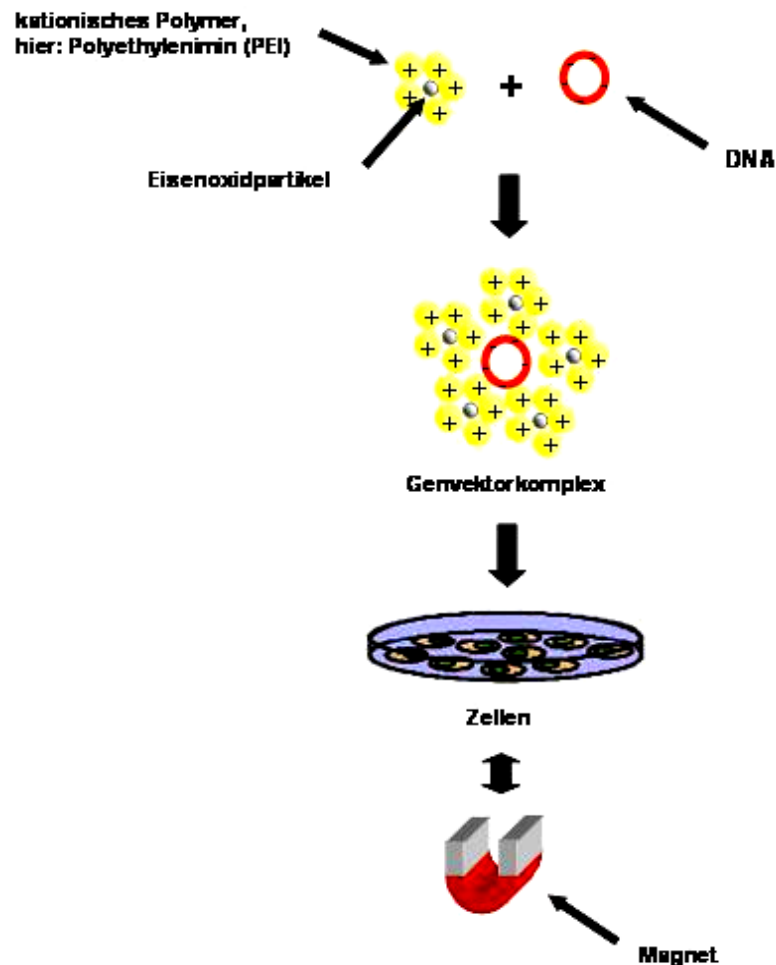


Abbildung 4: **Das Prinzip der Magnetofektion.**

Die Vorteile der Magnetofektion *in vitro* sind ihre außerordentliche Schnelligkeit und hohe Effizienz schon bei geringen Genvektorkomplexkonzentrationen (Plank *et al.*, 2003b). *In vivo* erlaubt die Magnetofektion die Barrieren des pulmonalen Gentransfers, z.B. Lungensurfactantfilm, Mukusschicht und Glykokalix, wie sie beispielsweise bei einer potentiellen Gentherapie der Cystischen Fibrose auf Aerosolbasis ein Hindernis darstellen, zu überwinden (Gersting *et al.*, 2004). Insbesondere könnte durch den Einsatz der Magnetofektion die sonst aufgrund der mukoziliären Clearance kurze Kontaktzeit der Genvektorkomplexe mit der Zelloberfläche verlängert werden (solange wie das magnetische Feld angelegt ist).

Abbildung 5 zeigt die *in vitro* Anwendung der Magnetofektion im 96-Well-Maßstab. Zunächst werden aus der DNA und den superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln Genvektorkomplexe hergestellt. Die superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikel sind mit

einem kationischen Polymer, hier mit PEI beschichtet. Wie bei einer Standard-Transfektion werden die Genvektorkomplexe zu den Zellen gegeben. An Stelle einer Inkubation von 4 h bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit, wird die 96-Well-Platte auf einer Platte mit 96 kleinen Stabmagneten (NdFeB), die die Größe eines Wells haben, für 15 min bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend werden die Zellen wie bei der Standard-Transfektion für weitere 24 h inkubiert.

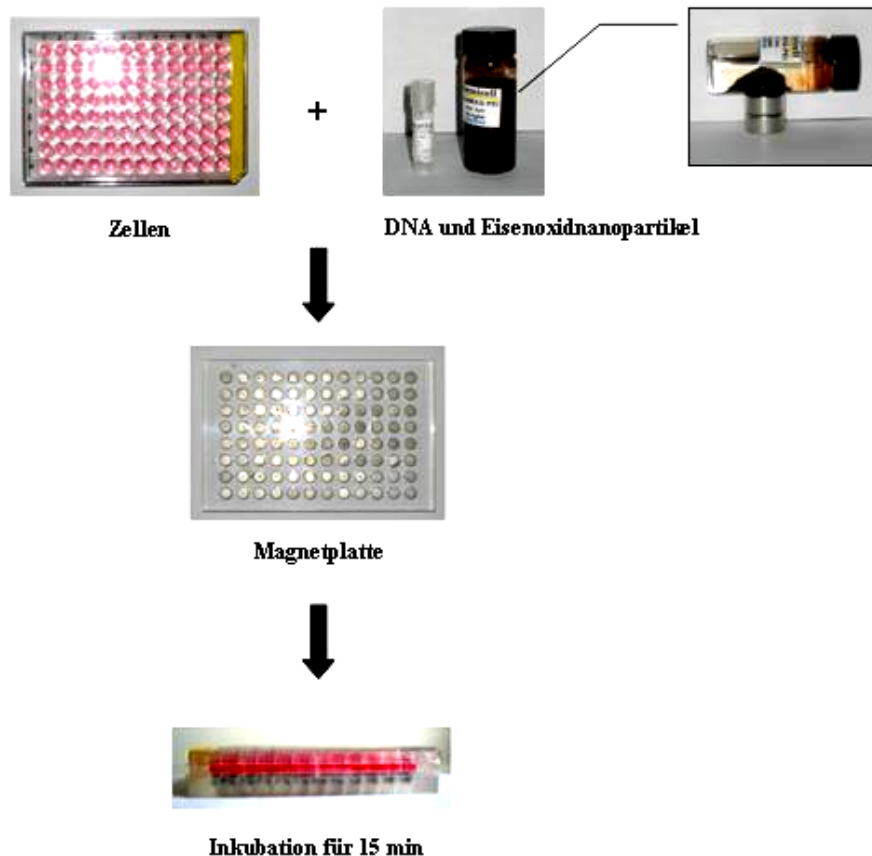


Abbildung 5: Anwendung der Magnetofektion im 96-Well-Maßstab.

1.5 Die Zellkernmembran als weitere Barriere für den erfolgreichen Gentransfer

Auf dem Weg zur Expression des transferierten Gens muss die für dieses Gen kodierende DNA verschiedene Barrieren überwinden (vgl. 1.3 Aufnahme und intrazellulärer Transport synthetischer Genvektorkomplexe). Die erste Barriere ist die Zytoplasmamembran, die die DNA kondensiert in Komplexen über den Mechanismus der Endozytose passiert. Die zweite

Barriere ist die Endosomenmembran. Durch Lyse der Endosomen erreicht die DNA schließlich das Zytoplasma. Als letzte Barriere muss die DNA die Zellkernmembran überwinden um transkribiert werden zu können.

Dieser letzte Schritt stellt das größte Hindernis für den effizienten Gentransfer synthetischer Genvektorkomplexe dar (Pollard *et al.*, 2001; Zabner *et al.*, 1995). Es konnte gezeigt werden, dass die Mikroinjektion „nackter“ Plasmid DNA direkt in den Zellkern zu einer sehr viel höheren Genexpressionsrate führt als die Injektion „nackter“ Plasmid DNA in das Zytoplasma (Capecci, 1980; Zabner *et al.*, 1995). Die Effizienz mit der Plasmid DNA in den Zellkern gelangt liegt bei 1 von 1000 Plasmiden (Pollard *et al.*, 2001).

Der Zellkern ist von einer Doppelmembran umgeben, in den der Kernporenkomplex (NPC) eingebettet ist. Der NPC vermittelt den intrazellulären Transport von Proteinen und RNA zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma (Gorlich and Kutay, 1999). Der Durchmesser dieser Poren beträgt 25 nm und limitiert den Eintritt der Plasmid DNA (Elouahabi and Ruyschaert, 2005). Die Größe der Polyplexe liegt beispielsweise für B-PEI mit 40 bis 60 nm weit darüber (Tang and Szoka, 1997).

Die DNA gelangt über zwei Mechanismen in den Zellkern. Durch passiven Eintritt während der Zellteilung, währenddessen die Zellkernmembran zeitweise zerstört ist, und durch aktiven Transport durch die Zellkernporen (Elouahabi and Ruyschaert, 2005).

1.6 Zielsetzung der Dissertation

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Aufnahme und den intrazellulären Transport neuartiger synthetischer Genvektorkomplexe, sowie deren Verbleib innerhalb der Zelle aufzuklären. Diese Erkenntnisse sollen langfristig zur Entwicklung effizienterer Genvektoren, einer höheren Gentransferrate und länger andauernder Genexpression führen.

Zunächst sollte der Mechanismus der Magnetofektion näher charakterisiert werden. Hierbei handelt es sich um eine viel versprechende neue Transfektionsmethode, die superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel als Genvektoren nutzt. Die Magnetofektion führt zu einer deutlichen Steigerung der Gentransferraten (Scherer *et al.*, 2002). Die Ursache dieser gesteigerten Gentransfereffizienz sollte hier näher untersucht werden. Von der Standard-Transfektion mit PEI ist bekannt, dass die Aufnahme der Genvektorkomplexe in die Zelle endozytotisch erfolgt (Kopatz *et al.*, 2004; Mislick and Baldeschwieler, 1996). Für die bei der Magnetofektion verwendeten Genvektorkomplexe wurde angenommen, dass sie sich

ebenso wie bei der Standard-Transfektion verhalten, und über Endozytose in die Zelle aufgenommen werden. Ein durch die Kraft des Magneten erzeugter direkter Transport der Genvektorkomplexe in die Zelle (Magnetoporation) wäre aber ebenso denkbar.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Rolle der Caveolae für die Aufnahme synthetischer Genvektorkomplexe analysiert werden. Von den Caveolae ist bekannt, dass bestimmte Viren, z.B. das SV 40-Virus, über diese endozytotischen Vesikel in Zellen gelangen (Parton, 2003). Des Weiteren ist bekannt, dass Caveolae vor allem in Endothelzellen und Typ I Pneumozyten vorkommen (Gumbleton *et al.*, 2000; Newman *et al.*, 1999; Razani *et al.*, 2002). Da nach intravenöser Applikation von Genvektorkomplexen gerade in diesen Zellen Genexpression beobachtet wird, wäre es denkbar, dass Aufnahme und Transport der Genvektorkomplexe über Caveolae vermittelt wird. Dieser Aufnahmemechanismus wurde für nicht-virale Genvektoren bislang nicht untersucht. Es sollten auch eventuelle Unterschiede der zellulären Vorgänge zwischen den Versuchsbedingungen *in vitro* und *in vivo* berücksichtigt werden.

Schließlich sollte der Transport der DNA unter Verwendung synthetischer Genvektoren in den Zellkern untersucht werden. Dabei stellte sich insbesondere die Frage, ob und in welchem Zellkompartiment die Dissoziation der Genvektorkomplexe respektive das Freisetzen der DNA aus diesen Komplexen stattfindet. Diese Dissoziation ist die Voraussetzung für die Transkription bzw. Translation der entsprechenden Gene. Der Transport synthetischer Genvektorkomplexe in den Zellkern, stellt den derzeit limitierendsten Faktor für den erfolgreichen Gentransfer dar. Um diese Vorgänge näher untersuchen zu können sollte ein zellfreies System konstruiert werden. Es sollte die Betrachtung der Vorgänge zwischen Genvektorkomplex und Zellkern ohne den störenden Einfluss des Zytoskeletts oder endozytotischer Vesikel ermöglichen.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Verwendete Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind mit entsprechendem Zelltyp und Bezugsquelle in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: **Verwendete Zelllinien**

Zelllinie	Zelltyp	Bezugsquelle
BEAS-2B	humane Bronchialepithelzellen (Virus-transformiert)	ATCC No: CRL-9609 ¹
EA.hy 926	humane Endothelzellen (Fusion von HUVEC* und A549**)	Dr. Florian Krötz ²
16 HBE14o ⁻	humane Bronchialepithelzellen (SV40-transformiert)	Prof. Dr. Dieter C. Gruenert ³
HeLa	humanes Cervixkarzinom	DSMZ No: ACC 57 ⁴
Hep-G2	humanes Leberzellkarzinom	DSMZ No: ACC 180 ⁴

¹ American Type Culture Collection

² Institut für Physiologie der LMU München

³ University of Vermont, Burlington, VT, USA

⁴ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

* Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen

** humanes Lungenzellkarzinom

2.1.2 Anzuchtbedingungen und Subkultivierung

Die Zellen aller hier verwendeten Zelllinien wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen (BD Falcon; San Jose, CA, USA) bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit in einem

Begasungsbrutschrank (Heraeus Instruments GmbH; Hanau) in Kultur gehalten. Alle 3-4 Tage wurde das Medium gewechselt bzw. die Zellen wurden passagiert/subkultiviert. Die Subkultivierung der Zellen erfolgte mittels Zugabe von Trypsin-EDTA (Ethylendiamintetraacetat). Die Zellen wurden zuvor mit Phosphat gepufferter Saline (PBS) (pH 7,4) ohne Zusatz von Calcium- bzw. Magnesium-Ionen gewaschen. Zur Durchführung von Experimenten wurden die Zellen in 96-Well-Plates (TPP®; Trasadingen, Schweiz) bzw. 4-Chamber-Slides (BD Falcon; San Jose, CA, USA) ausgesät. Um die Zellzahl zu bestimmen wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop (Axiovert 25/Zeiss; Jena) ausgezählt. Nach ca. 30 Passagen wurden die Zellen verworfen und neue Zellen aufgetaut (zur Langzeitlagerung wurden die Zellen in einem Tank mit flüssigem Stickstoff in einer Mischung aus Medium und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) eingefroren).

2.1.3 Kulturmedien und Supplemente

Entsprechend der Zelllinie wurden die Zellen entweder in „Minimal Essential Medium“ (MEM) (BEAS-2B, HeLa, Hep-G2 und 16 HBE14o⁻ Zellen) oder in „Dulbeccos MEM“ (DMEM) (EA.hy 926 Zellen) kultiviert.

Die notwendigen Wachstumsfaktoren wurden den Zellen durch Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (FCS) zum Medium zur Verfügung gestellt. Da die Bestandteile des FCS mit den Genvektorkomplexen interagieren und so die Transfektionsexperimente stören, wurde während der Transfektionen auf den Zusatz von FCS im Medium verzichtet.

Um bakterielle Kontaminationen nach den Transfektionen zu vermeiden wurden den Medien Antibiotika in folgenden Konzentrationen zugesetzt:

0,1% Penicillin/Streptomycin (v/v)

0,5% Gentamicin (v/v)

2.2 Präparation der Genvektorkomplexe

2.2.1 Verwendete Plasmide und Vektoren

Die zur Herstellung der Genvektorkomplexe benutzten Plasmide sind unter Angabe des entsprechenden Reportergens und Referenz in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: **Verwendete Plasmide**

Plasmid	Reportergen	Referenz
pBLuc	Luziferase	Andrew Baker ¹
pCMV-Luc	Luziferase	Prof. Dr. Ernst Wagner ²
pEGFPLuc	Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) und Luziferase	Clontech ³
pEGFP-N1	EGFP	Clontech ³
pEGFP-N1ΔSV40	EGFP	Andreas Laner ⁴
pGZUBI	-	Seng Cheng ⁵

¹ Bayer, USA² Department Pharmazie, LMU München³ Palo Alto, CA, USA⁴ Department Biologie II, LMU München⁵ Genzyme, Framingham, MA, USA

Die verwendeten Plasmide wurden in *Escherichia coli* amplifiziert und gereinigt von der PlasmidFactory GmbH & Co. KG (Bielefeld) bezogen.

Die zur Herstellung der Genvektorkomplexe verwendeten Vektoren sind unter Angabe des entsprechenden Vektortyps und Bezugsquelle in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: **Verwendete Vektoren**

Vektor	Vektortyp	Bezugsquelle
B-PEI (25 kDa; durchschnittlicher Grad der Polymerisierung = 580; dialysiert gegen H ₂ O, Ausschlussgrenze: 10-12 kDa)	kationisches Polymer	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
L-PEI (22 kDa)	kationisches Polymer	Jean-Serge Rémy ¹

Jet-PEI-FluoF™ (lineares PEI, Fluorescein-markiert)	kationisches Polymer	Polyplus-Transfection, Illkirch, France
transMAG ^{PEI} (16/1) (überzogen mit PEI/800 kDa; durchschnittliche Größe = 200 nm)	superparamagnetische Eisenoxid- Nanopartikel	Chemicell, Berlin (Povey <i>et al.</i> , 1986)
1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3- trimethylammoniumpropan (DOTAP)	kationisches Lipid	Sigma-Aldrich, Schnelldorf

¹ Laboratoire de Chimie Genetique, Faculte de Pharmacie, Illkirch, France

2.2.2 Das N/P-Verhältnis

Das N/P-Verhältnis gibt das Verhältnis der Stoffmengen von Stickstoff im kationischen Vektor zu Phosphat in der Plasmid DNA an. Je höher das N/P-Verhältnis ist, desto mehr kationischer Vektor wird für die Komplexierung der DNA verwendet.

Die N/P-Verhältnisse wurden nach folgender Gleichung berechnet:

Für das kationische Polymer PEI:

$$\frac{N}{P} = \frac{m(\text{PEI})}{43,069 \text{ g mol}^{-1}} \cdot \frac{330 \text{ g mol}^{-1}}{m(\text{DNA})}$$

Hierbei gibt 330 g mol^{-1} den Mittelwert des Molekulargewichts der kleinsten sich wiederholenden (negative Ladung tragenden) Einheit der DNA, nämlich dem Deoxynukleotid an und $43,069 \text{ g mol}^{-1}$ den Mittelwert des Molekulargewichts der kleinsten sich wiederholenden (mögliche positive Ladung tragenden) Einheit des Polymers PEI: $-\text{N}(\text{CH}_2)_2-$

Für das kationische Polymer PLL:

$$\frac{N}{P} = \frac{m(\text{PLL})}{129,057 \text{ g mol}^{-1}} \cdot \frac{330 \text{ g mol}^{-1}}{m(\text{DNA})}$$

Hier gilt entsprechend, $129,057 \text{ g mol}^{-1}$ ist der Mittelwert des Molekulargewichts der kleinsten sich wiederholenden Einheit von PLL: $\text{-NHCH(CH}_2)_4\text{NH}_2\text{CO-}$

2.2.3 Herstellung der Komplexe

Die Plasmid DNA und die Vektoren wurden zunächst getrennt voneinander je nach Experiment in HEPES gepufferter Saline (HBS) (150 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7,3) oder in 5 % Glucose verdünnt.

Für die Magnetofektionen im 96-Well-Maßstab wurden $0,5 \text{ }\mu\text{g}$ DNA (pCMV-Luc) pro Well mit $1 \text{ }\mu\text{g}$ transMAG^{PEI} komplexiert; dies entspricht einem Verhältnis von Partikeln zu DNA von 2:1 (w/w). Die zum Vergleich mit den Magnetofektionen durchgeführten Transfektionen wurden mit $0,25 \text{ }\mu\text{g}$ DNA (pCMV-Luc) pro Well und B-PEI in einem N/P-Verhältnis von N/P = 7 durchgeführt. Die Lösungen wurden hier in HBS hergestellt.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die Magnetofektionen für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden mit $1,25 \text{ }\mu\text{g}$ gold-markierter DNA (pCMV-Luc) pro 35 mm Petrischale durchgeführt, ebenfalls in einem Verhältnis von 2:1 (w/w).

Markierung der DNA mit Gold:

Durch die hohe Elektronendichte von Gold lässt sich Gold-markierte DNA in elektronenmikroskopischen Aufnahmen gut sichtbar machen. Die Gold-Markierung der DNA beruht auf der hohen Affinität zwischen Streptavidin und Biotin. Die DNA wurde mittels des Lable It® Biotin labeling kit (Mirus Bio Corporation; Madison, WI, USA) wie vom Hersteller beschrieben biotinyliert. $0,04 \text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Streptavidin konjugiert an Goldpartikel (Amersham Biosciences; Buckinghamshire, UK) wurden zu $0,077 \text{ }\mu\text{g}$ biotinylierter DNA/ μl gegeben und 1 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert.

in vitro Kolokalisationsstudien

Für die Transfektionen in 4-Chamber-Slides wurden $1 \text{ }\mu\text{g}$ DNA (pCMV-Luc) mit B-PEI in einem N/P-Verhältnis von N/P = 10 komplexiert. Als Solvens diente HBS bzw. 5 % Glucose. Der Vektor B-PEI wurde mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) fluoreszenzmarkiert.

FITC-Markierung von PEI:

Zur Herstellung von FITC-markiertem PEI wurde B-PEI (15 mg dialysiert gegen destilliertes Wasser) auf 300 µl mit Na₂CO₃ (pH = 9) verdünnt und mit einem 10-fachen molaren Überschuss von 5(6)-Carboxyfluorescein für 1,5 h inkubiert. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung über PD-10 Sephadex G-25 Säulen (Amersham Biosciences Europe GmbH; Freiburg). Der Grad der Modifikation wurde mit ~3 bestimmt; basierend auf der photometrischen Messung von FITC und der Quantifizierung von B-PEI mittels eines auf Kupfer basierenden Assays (Ungaro *et al.*, 2003).

in vivo Kolokalisationsstudien

Für die Kolokalisationsstudien *in vivo* wurden Genvektoren basierend auf FITC-B-PEI, Jet-PEI-FluoF™ und Fluorescein-markiertem DOTAP verwendet. Die DNA (pCMV-Luc) wurde mittels des Lable It® Nucleic Acid CX-Rhodamine Labelling Kit (Mirus Bio Corporation; Madison, WI, USA) mit Rhodamin fluoreszenzmarkiert. Für die Komplexherstellung wurden 25 µg DNA und PEI-Vektoren in einem N/P-Verhältnis von N/P = 10, bzw. DOTAP in einem N/P-Verhältnis von N/P = 4,8 (Bragonzi *et al.*, 1999) gelöst in 5 % Glucose eingesetzt.

Herstellung der Liposomen:

Zur Herstellung der Liposomen wurden 2 mg DOTAP in 1 ml Chloroform gelöst. Um die Liposomen mit Fluorescein zu markieren wurden 2,8 µl einer in Chloroform hergestellten Stock-Lösung (5 mg/ml) von Fluorescein-DHPE (N-(Fluorescein-5-Thiocarbamoyl)-1,2-Dihexadecanoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin, Triethylammoniumsalz) (Molecular Probes; Leiden, Niederlande) zugegeben. Die so entstandene Lösung wurde mittels CO₂ abgedampft und in 1 ml H₂O gelöst. Schließlich wurde die Lösung in einem Ultraschallbad inkubiert bis sie klar wurde.

Die Größe der Liposomen wurde mittels dynamischer Lichtstreuung (Zeta Pals-Zeta Potential Analyzer/Brookhaven Instrument Corporation; Holtsville, NY, USA) gemessen. Dazu wurden 10 Messungen bei folgenden Messparametern durchgeführt:

Temperatur: 25°C

Flüssigkeit: Wasser

Viskosität: 0,890 cP

Die Messung der Liposomen ergab einen Durchmesser von 337 nm bei einer Polydispersität von 0,213.

Studien an isolierten Zellkernen

Für die Experimente mit isolierten Zellkernen wurden pro Ansatz 5 µg DNA (pEGFP-N1 für die Quantifizierungsversuche/Durchflußzytometrie und pEGFPLuc für die Southern Blot Analysen) mit B-PEI bzw. L-PEI in einem N/P-Verhältnis von N/P = 10, und mit PLL in einem N/P-Verhältnis von N/P = 2 komplexiert. Die zum Vergleich durchgeführten Transfektionen wurden im 96-Well-Maßstab unter Verwendung der gleichen N/P-Verhältnisse und mit 0,5 µg DNA (pBLuc) durchgeführt. Die Lösungen wurden in 5 % Glucose hergestellt.

Die Volumina der eingesetzten Plasmid DNA bzw. der kationischen Vektoren wurden wie folgt berechnet:

$$V_{(DNA)} = \frac{m(DNA) \cdot n \cdot 1,2}{c(DNA)}$$

$$V_{(Verdünnungslösung)} = n \cdot 25 \mu l \cdot 1,2 - V_{(DNA)} \quad (96\text{-Well-Plate})$$

$$V_{(Verdünnungslösung)} = n \cdot 125 \mu l \cdot 1,2 - V_{(DNA)} \quad (4\text{-Chamber-Slide})$$

n = Anzahl der Wells bzw. Chambers

Der Faktor 1,2 steht für eine 20 %ige Reserve an Volumen.

Durch Gleichsetzen der Gleichungen für die Volumenberechnung und der Berechnung des N/P-Verhältnisses ergibt sich für die Vektoren:

$$V_{(Polymer)} \cdot \frac{c(Polymer)}{m(Polymer) \cdot n \cdot 1,2} = \frac{N}{P} \cdot \frac{M(Polymer)}{m(Polymer)} \cdot \frac{m(DNA)}{330 \text{ g mol}^{-1}}$$

$$V_{(\text{Polymer})} = \frac{N}{P} \cdot \frac{m(\text{DNA}) \cdot n \cdot 1,2 \cdot M(\text{Polymer})}{c(\text{Polymer}) \cdot 330 \text{ g mol}^{-1}}$$

M (Polymer) steht für die unter 2.2.2 „Das N/P-Verhältnis“ erwähnten Molekulargewichte der jeweils kleinsten sich wiederholenden Einheit.

Daraus ergibt sich:

$$V_{(\text{PEI})} = \frac{N}{P} \cdot \frac{m(\text{DNA}) \cdot n \cdot 1,2}{c(\text{PEI}) \cdot 7,662}$$

$$V_{(\text{PLL})} = \frac{N}{P} \cdot \frac{m(\text{DNA}) \cdot n \cdot 1,2}{c(\text{PLL}) \cdot 2,557}$$

Bei Verwendung der transMAG^{PEI} als Vektoren gilt:

$$V_{(\text{transMAG}^{\text{PEI}})} = \frac{w}{w} \cdot \frac{m(\text{DNA}) \cdot n \cdot 1,2}{c(\text{transMAG}^{\text{PEI}})}$$

Für alle Vektoren gilt:

$$V_{(\text{Verdünnungslösung})} = n \cdot 25 \mu\text{l} \cdot 1,2 - V_{(\text{Polymer})} \quad (96\text{-Well-Plate})$$

$$V_{(\text{Verdünnungslösung})} = n \cdot 125 \mu\text{l} \cdot 1,2 - V_{(\text{Polymer})} \quad (4\text{-Chamber-Slide})$$

Die Vektor-Lösungen wurden jeweils vorsichtig zur Plasmid DNA-Lösung gegeben und durch sorgfältiges auf und ab pipettieren gemischt. Die daraus resultierenden Genvektorklösungen wurden vor Gebrauch für 20 min bei RT inkubiert.

2.3 Magnetofektion bzw. Transfektion

Für die Magnetofektions- bzw. Transfektions-Experimente wurden die Zellen (10 000 Zellen pro Well, 96-Well-Plate/100 000 pro Chamber, 4-Chamber-Slide) einen Tag vor der Magnetofektion/Transfektion ausgesät.

Bei einer Konfluenz von ca. 80 % (40 % bei Verwendung der 4-Chamber-Slides) wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 150 µl (bzw. 750 µl) Medium ohne FCS pro Well (bzw. Chamber) vorgelegt und 50 µl (bzw. 250 µl) Komplexlösung (siehe 2.2.3 Herstellung der Komplexe) zugegeben. Bei der Transfektion betrug die anschließende Inkubationszeit 4 h bei 37°C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit. Für die Magnetofektion wurden die Zellen für 15 min (37°C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit) auf gesinterten NdFeB Magneten (NeoDelta/Remanenz Br: 1080-1150 mT/IBS Magnet; Berlin) platziert. Die verwendeten Magneten sind zylindrisch (d = 6 mm, h = 5 mm) und wurden mit strikt alternierender Polarität in eine Acrylglasplatte im 96-Well-Format eingelassen. Die Felder der einzelnen Magneten beeinflussen sich gegenseitig, so dass die Vektordosis sich jeweils in der Mitte der Wells konzentriert.

Die Magnetofektionen für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen in 35 mm Petrischalen wurden freundlicherweise von Dr. S. Gersting durchgeführt. Hierzu wurden 300 000 Zellen pro 35 mm Petrischale ausgesät. Bei einer Konfluenz von 40 % wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Für die Magnetofektion wurden 345 µl der vorbereiteten Genvektorkomplexe (siehe 2.2.3 Herstellung der Komplexe) zu 1955 µl MEM pro Petrischale zugegeben. Wurden nur die transMAG^{PEI}-Partikel benutzt, so wurde dasselbe Volumen ohne DNA eingesetzt. Die Zellen wurden 1 min, 5 min und 15 min auf Magneten (mit einem Durchmesser von 15 mm/IBS Magnet; Berlin), die mittig unter den Petrischalen platziert wurden inkubiert (37°C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit). Ein Teil der Petrischalen, die für 15 min inkubiert wurden, wurden anschließend für weitere 24 h bei 37°C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die anderen Zellen wurden sofort für die Elektronenmikroskopie vorbereitet (siehe 2.12.1 Elektronenmikroskopie).

Nach der Magnetofektion/Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen, und 200 µl pro Well (bzw. 1ml pro Chamber, bzw. 2 ml pro Petrischale) Medium mit 10 % FCS supplementiert mit 0,1 % Penicillin/Streptomycin (v/v) und 0,5 % Gentamicin (v/v) wurden zugegeben, gefolgt von einer weiteren Inkubation für 24 h bei 37°C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit.

2.3.1 Inhibierung der Endozytose

Die zur Hemmung der Endozytose eingesetzten Inhibitoren sind einschließlich der eingesetzten Endkonzentrationen in Tabelle 4 aufgelistet. Abbildung 6 zeigt die Angriffspunkte der Endozytoseinhibitoren.

Tabelle 4: Endozytoseinhibitoren und eingesetzte Endkonzentrationen

Endozytoseinhibitor	Endkonzentration
Antimycin A	1 µg/ml
Chloroquin	100 µM
Monensin	10 µM
Progesteron	10 µg/ml
Nystatin	25 µg/ml
Phorbolmyristataacetat (PMA)	160 nM
Colchizin	5 µM
Nocodazol	2,5 µM
Taxol	0,25 µM
Cytochalasin B	5 µg/ml

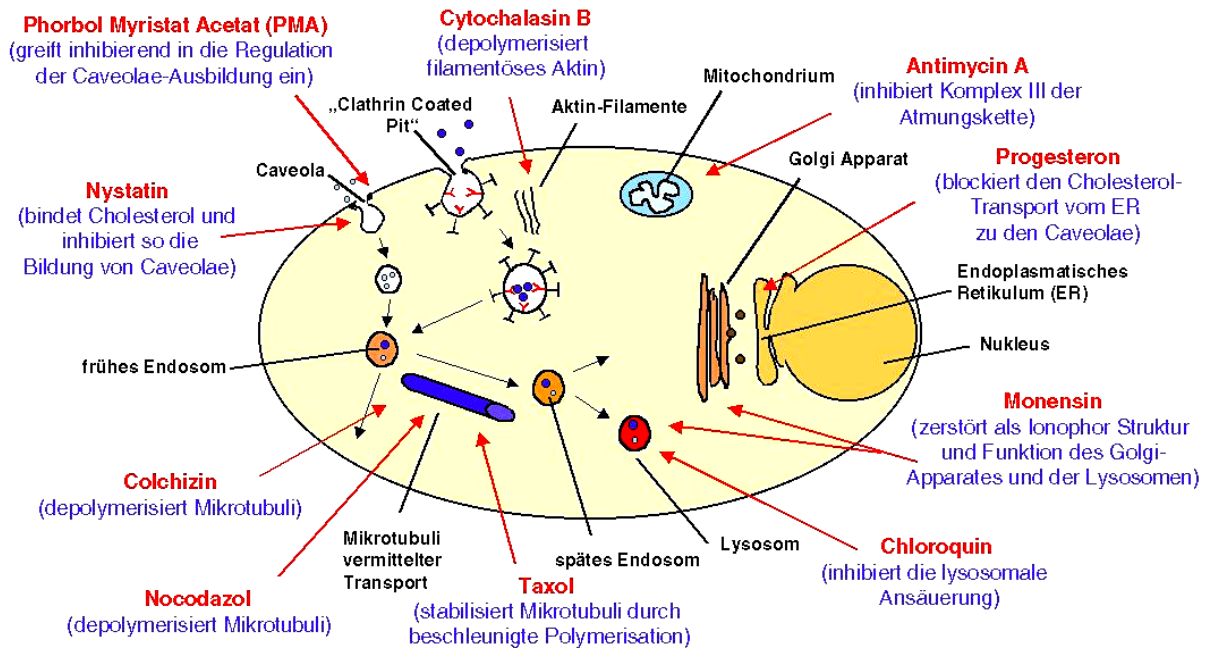


Abbildung 6: **Verwendete Endozytoseinhibitoren und ihre Wirkorte.**

Den zuvor mit PBS gewaschenen Zellen wurden 150 µl der Inhibitor-Lösungen verdünnt in Medium mit 10% FCS zugegeben. Als Kontrolle wurden 150 µl Medium ohne Inhibitor-Lösung eingesetzt. Für die Magnetofektion wurden die Zellen für 30 min mit den Inhibitoren inkubiert, die Zellen für die Transfektion wurden für 35 min inkubiert (jeweils bei 37°C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit).

Danach erfolgte die Zugabe der Genvektorkomplexe. Um die Inkubationszeiten mit den Inhibitoren zwischen Magnetofektion und Transfektion einander anzupassen, wurden die Zellen an Stelle der Standardbedingungen (4 h Inkubation bei 37°C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit) für 10 min bei 37°C und 300 g zentrifugiert (Abb. 7).

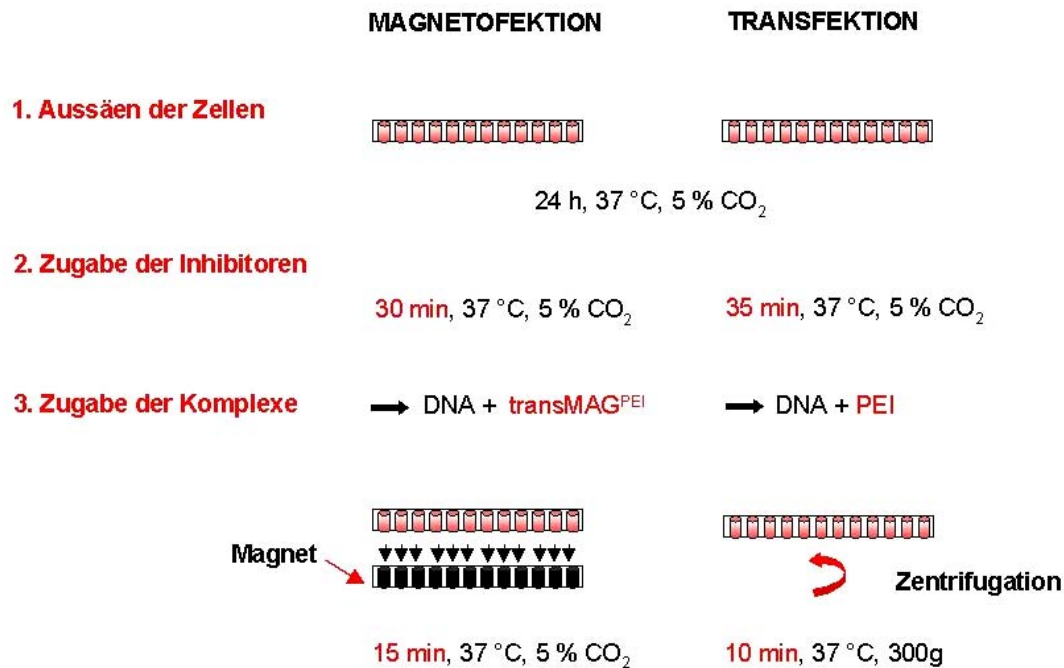


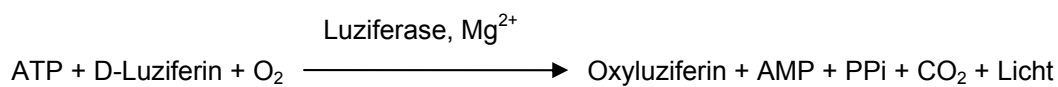
Abbildung 7: **Darstellung der experimentellen Vorgehensweise beim Vergleich zwischen Magnetofektion und Transfektion.**

2.4 Bestimmung der Luziferaseaktivität

Die Luziferaseexpression wurde 24 h nach der Magnetofektion/Transfektion gemessen. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 100 µl Lysepuffer (250 mM N, N, N-Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), 0,1 % Triton X-100, pH 7,8) wurde pro Well zugegeben. Die Zellen wurden für 15 min bei RT lysiert. Anschließend wurden jeweils 50 µl der Proben in einem Wallac Victor²/1420 Multilabel Counter (PerkinElmer; Rodgau-Jügesheim) vermessen. Hierbei werden pro Probe automatisch 100 µl Luziferase-Assay-Puffer (470 µM D-Luziferin; 270 µM Coenzym A; 33,3 mM Dithiothreitol (DTT); 530 µM Adenosintriphosphat (ATP); 1,07 mM (MgCO₃)₄Mg₂ x 5 H₂O; 2,67 mM MgSO₄; 20 mM Tricin; 0,1 mM EDTA) (Surovoy *et al.*, 1998) injiziert und die daraus resultierende Lichtemission wird über 5 s lang gemessen. Vor der Injektion wird der Hintergrund jedes Wells gemessen und vom nach der Injektion gemessenen Wert subtrahiert. Die Proteinkonzentration jeder Probe wurde mit Hilfe eines Standard Protein Assays (BioRad; München) bestimmt (Methode nach Bradford).

2.5 Untersuchungen zur Zellvitalität

Um die Zellvitalität der mit den Endozytoseinhibitoren inkubierten Zellen zu untersuchen wurde ein auf ATP basierender Zellproliferationstest (ATPlite/PerkinElmer; Boston, MA, USA) verwendet. Dieser Test bestimmt die Anzahl lebender Zellen anhand der Anwesenheit von ATP in allen metabolisch aktiven Zellen. Die ATP-Konzentration nimmt rapide ab, wenn die Zellen durch Nekrose sterben. Der Test beruht auf der Produktion von Licht, welches durch die Reaktion von ATP mit zugesetzter Luziferase und D-Luziferin entsteht. Das emittierte Licht ist der ATP-Konzentration proportional:



Die Zellen (10 000 Zellen pro Well, 96-Well-Plate) wurden einen Tag vor der Zugabe der Endozytoseinhibitoren ausgesät und in Medium mit 10 % FCS kultiviert. Bei einer Konfluenz von ca. 80 % wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 150 µl der Inhibitorlösungen, verdünnt in Medium mit 10 % FCS, wurden pro Well in denselben Konzentrationen wie unter 2.3.1 „Inhibierung der Endozytose“ beschrieben für 45 min zugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 200 µl Medium supplementiert mit 10 % FCS, 0,1 % Penicillin/Streptomycin (v/v) und 0,5 % Gentamicin (v/v) wurden pro Well zugegeben, gefolgt von einer weiteren Inkubation für 24 h bei 37°C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit. Die Zellen wurden schließlich nochmals gewaschen und 100 µl Medium plus 10 % FCS wurden zugegeben. Das weitere Vorgehen erfolgte wie vom Hersteller beschrieben. Die Lumineszenz wurde in einem Wallac Victor²/1420 Multilabel Counter (PerkinElmer; Rodgau-Jügesheim) gemessen.

2.6 Nachweis der Endozytoseaktivität

Als positiver Marker für Clathrin-vermittelte Endozytose wurde FITC-markiertes Transferrin-Polylysin (Sigma-Aldrich; Schnellendorf) verwendet. Alexa Fluor® 594 Cholera Toxin Untereinheit B (CT-B) Konjugat (Molecular Probes; Leiden, Niederlande) wurde als positiver Marker für Caveolae (Ferrari *et al.*, 2003) eingesetzt.

Die Zellen wurden einen Tag vor der Zugabe der Endozytosemarker ausgesät (20 000 Zellen pro Chamber) und in Medium mit 10 % FCS angezogen.

Vor Zugabe der Marker wurden die Zellen mit PBS gewaschen. 0,5 μ M FITC- Transferrin-Polylysin verdünnt in Medium wurde für 15 min zugegeben (37°C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit). Nach erneutem Waschen der Zellen mit PBS wurden 10 μ g/ml des Alexa Fluor 594 Cholera toxin Untereinheit B (CT-B) Konjugats verdünnt in Medium für weitere 15 min zugegeben (37°C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit).

Anschließend wurden die Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie mit 4 % Paraformaldehyd (pH 7,4) für 10 min fixiert, mit PBS gewaschen und zum Schutz vor Ausbleichen mit einem „Mounting medium“ bedeckt (vectashield®/Vector Laboratories Inc.; Burlingame, CA, USA). Schließlich wurden die Zellen unter dem Epifluoreszenzmikroskop betrachtet (siehe 2.12.2 Epifluoreszenzmikroskopie).

2.7 Untersuchungen zur Kolokalisation der Genvektorkomplexe mit Caveolae

2.7.1 *in vitro*

Die Zellen wurden einen Tag vor der Zugabe der Genvektorkomplexe ausgesät (100 000 Zellen pro Chamber) und in MEM mit 10 % FCS angezogen. Nach der Transfektion mit den fluoreszenzmarkierten Genvektorkomplexen (siehe 2.2.3 Herstellung der Komplexe) wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 4 % Paraformaldehyd (pH 7,4) für 10 min im Dunkeln fixiert. Zum Schutz vor Ausbleichen der Präparate wurden alle folgenden Schritte im Dunkeln durchgeführt. Die Zellen wurden mit 0,1 % Triton X-100, 0,2 % Bovines Serum Albumin (BSA) in PBS für 10 min permeabilisiert. Danach wurden die freien Aldehydgruppen mit 25 mM NH₄Cl in PBS für 10 min abgesättigt. Nach Waschen der Zellen mit PBS wurden sie mit einem Caveolin-1 (N-20) Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Santa Cruz, CA, USA) (1:200 in PBS mit 0,1 % Triton X-100, 0,2 % BSA in PBS) für 1 h inkubiert. Im Anschluss an einen weiteren Waschschriff mit PBS wurden die Zellen für 1 h mit einem sekundären, mit Alexa Fluor®568 (Molecular Probes; Leiden, Niederlande) markierten, Antikörper (1:1000 in PBS mit 0,1 % Triton X-100, 0,2 % BSA) inkubiert. Die Zellkerne wurden mit 0,33 μ M 4', 6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) für 3 min angefärbt.

Anschließend wurden die Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie mit 4 % Paraformaldehyd (pH 7,4) für 10 min fixiert, mit PBS gewaschen und zum Schutz vor Ausbleichen mit einem „Mounting medium“ bedeckt (vectashield®/Vector Laboratories Inc.; Burlingame, CA,

USA). Schließlich wurden die Zellen unter dem Epifluoreszenzmikroskop betrachtet (siehe 2.12.2 Epifluoreszenzmikroskopie).

2.7.2 in vivo

Um die Lokalisation der Genvektorkomplexe mit Caveolae *in vivo*, in der Lunge, zu untersuchen wurden C57BL/6-Mäusen ($n = 2$) fluoreszenzmarkierte Genvektorkomplexe in einem Volumen von 200 μ l in die Schwanzvene injiziert. Für die Komplexherstellung wurden 25 μ g DNA und PEI-Vektoren in einem N/P-Verhältnis von $N/P = 10$, bzw. DOTAP in einem N/P-Verhältnis von $N/P = 4,8$ (Bragonzi *et al.*, 1999) gelöst in 5 % Glucose eingesetzt (siehe 2.2.3 Herstellung der Komplexe).

Organentnahme und Anfertigung von Gefrierschnitten:

1 h nach der Genvektorapplikation wurden die Mäuse mit einer Pentobarbital-Lösung (Narcoren®) entsprechend 120 mg Pentobarbital pro kg Körpergewicht intraperitoneal narkotisiert. Anschließend wurden sie durch Genickbruch getötet. Nach medianem Hautschnitt am Bauch wurde die Haut stumpf vom Bauchmuskel abpräpariert. Danach wurde der Bauchmuskel median durchtrennt und damit das Peritoneum eröffnet. Im Anschluss wurde die Vena cava posterior durch einen Schnitt komplett durchtrennt und 10 ml - 15 ml einer mit Heparin (25 000 I. E. Heparin/1000ml) angereicherten isotonischen Kochsalzlösung langsam in den rechten Ventrikel des Herzens injiziert, um die Lungen von Blut zu reinigen. Als Nächstes wurde ca. 1 ml 4 % Paraformaldehyd (pH 7,4) durch die Trachea in die Lungen injiziert, und die Lunge vorsichtig inflatiert. Die Trachea wurde sofort mit einem chirurgischen Faden verschlossen und die Lungen so für 1 h fixiert. Anschließend wurden die Lungen mitsamt der Trachea frei präpariert und für weitere 5 h bei 4°C in 4 % Paraformaldehyd (pH 7,4) inkubiert. Die Lungen wurden danach in PBS gewaschen und in 30 %iger Sucroslösung (in PBS) für 24 h bei 4°C inkubiert. Schließlich wurde die Trachea abgetrennt und die einzelnen Lungenflügel eingebettet in O.C.T.™ Compound/Tissue-Tek® (Sakura Finetek Europe B.V.; Zoeterwoude, Niederlande) auf Trockeneis eingefroren und bis zur Herstellung von Gefrierschnitten bei -80°C eingefroren.

Die Herstellung der Gefrierschnitte erfolgte bei -20°C in einem Kryotom (Cryocut E; Leica, Bensheim). Es wurden 5 μ m dünne Schnitte angefertigt. Nach dem Trocknen der Schnitte über Nacht (im Dunkeln) wurden sie bei -20°C gelagert. Zur Vorbereitung für die

Epifluoreszenzmikroskopie wurden die Objektträger mit den Schnitten in PBS gewaschen. Zum Schutz vor Ausbleichen der Präparate wurden alle folgenden Schritte im Dunkeln durchgeführt.

Die Schnitte wurden mit 0,1 % Triton X-100, 0,2 % BSA in PBS für 10 min permeabilisiert. Danach wurden die freien Aldehydgruppen mit 25 mM NH_4Cl in PBS für 10 min abgesättigt. Nach Waschen der Schnitte mit PBS wurden sie mit einem Caveolin-1 (N-20) Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Santa Cruz, CA, USA) (1:200 in PBS mit 0,1 % Triton X-100, 0,2 % BSA in PBS) für 1 h inkubiert. Im Anschluss an einen weiteren Waschschriff mit PBS wurden die Schnitte für 1 h mit einem sekundären, mit Alexa Fluor®568 (Molecular Probes; Leiden, Niederlande) markierten, Antikörper (1:1000 in PBS mit 0,1 % Triton X-100, 0,2 % BSA) inkubiert.

Anschließend wurden die Schnitte für die Fluoreszenzmikroskopie mit 4 % Paraformaldehyd (pH 7,4) für 10 min fixiert, mit PBS gewaschen und zum Schutz vor Ausbleichen mit einem „Mounting medium“ bedeckt (vectashield®/Vector Laboratories Inc.; Burlingame, CA, USA). Schließlich wurden die Schnitte unter dem Epifluoreszenzmikroskop betrachtet (siehe 2.12.2 Epifluoreszenzmikroskopie).

2.8 Gewinnung isolierter und intakter Zellkerne

2.8.1 Dichtegradientenzentrifugation

Die Isolierung von Zellkernen aus 16HBE14o⁻ Zellen erfolgte mittels des „Nuclei pure prep nuclei isolation kit“ (Sigma-Aldrich; Schnellendorf).

Sie beruht auf der Zentrifugation der Zellen durch einen Saccharosepuffer definierter Konzentration, um so die Zellkerne vom Zytoplasma abzutrennen. Die so gewonnenen Zellkerne wurden zur Lagerung bei -80°C eingefroren.

2.8.2 Tests zur Intaktheit der Zellkerne

Trypanblaufärbung

Zur morphologischen Kontrolle der Intaktheit der Zellkerne bzw. um die Zellkerne auszuzählen wurden diese mit Trypanblau angefärbt und unter dem Lichtmikroskop (Axiovert 25/Zeiss; Jena) betrachtet.

0,5 % ige Trypanblaulösung:

0,9 g NaCl

0,5 g Trypanblaufarbstoff

ad 100 ml H₂O (eingesetzte Endkonzentration: 0,18 %)

Inkubation mit FITC-BSA:

Um die Intaktheit der isolierten Zellkerne zu testen wurden diese mit 3 μ M FITC-BSA für 4 h bei 37°C in Zelllysat (siehe 2.9 Studien an isolierten Zellkernen) inkubiert. Aufgrund des hohen Molekulargewichts des BSA (68 kDa) kann es bei intakten Zellkernen nicht durch die Zellkernporen in das Innere der Zellkerne diffundieren, sondern verbleibt extranukleär. Nach Waschen der Zellkerne mit PBS wurden diese mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) (3 μ g/ml in PBS) für 3 min angefärbt.

Anschließend wurden die Zellen für die Mikroskopie mit 4 % Paraformaldehyd (pH 7,4) für 10 min fixiert, mit PBS gewaschen und zum Schutz vor Ausbleichen mit einem „Mounting medium“ bedeckt (vectashield®/Vector Laboratories Inc.; Burlingame, CA, USA).

Schließlich wurden die Zellen unter dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop betrachtet (siehe 2.12.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie).

FITC-Markierung von BSA:

100 mg BSA (1,59 μ mol) (Roche; Penzberg) wurden in 2.0 ml PBS (pH 8,0) gelöst und mit einem 5-fachen Stoffmengenüberschuss 5(6)-Carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimidester (7,95 μ mol) für 1 h unter Lichtausschluss und Schütteln umgesetzt. Die Abtrennung des ungebundenen FITC erfolgte über eine PD-10 Säule (Amersham Biosciences Europe GmbH; Freiburg). Die Bestimmung des FITC-Konjugationsgrades (~ 1) erfolgte photometrisch (BSA $\epsilon_{278}=39.500/\text{Mcm}$, $\epsilon_{498}=82.500/\text{Mcm}$). In einem weiteren Schritt wurden die Konjugate über eine Sephadex G-25 superfine HR 10/10 Säule (Pharmacia; Uppsala, Schweden) gereinigt.

Brefeldin A-Färbung

Um zu untersuchen, ob sich noch Teile des Endoplasmatischen Retikulums (ER) an den isolierten Zellkernen befinden wurden diese mit 0,5 μ M Brefeldin A Bodipy® 558/568 Konjugat (Molecular Probes; Leiden, Niederlande), einem Fluoreszenzfarbstoff der das ER selektiv anfärbt, in PBS für 15 min im Dunkeln inkubiert. Die Zellkerne wurden mit 0,33 μ M DAPI für 3 min angefärbt.

Anschließend wurden die Schnitte für die Fluoreszenzmikroskopie mit 4 % Paraformaldehyd (pH 7,4) für 10 min fixiert, mit PBS gewaschen und zum Schutz vor Ausbleichen mit einem „Mounting medium“ bedeckt (vectashield®/Vector Laboratories Inc.; Burlingame, CA, USA).

Schließlich wurden die Zellen unter dem Epifluoreszenzmikroskop betrachtet (siehe 2.12.2 Epifluoreszenzmikroskopie).

2.9 Studien an isolierten Zellkernen

Pro Ansatz wurden 1×10^6 isolierte Zellkerne mit 40 µl der Genvektorkomplexe (siehe 2.2.3 Herstellung der Komplexe) in 100 µl Zelllysate (ZL) inkubiert. Das ZL besteht aus Kaninchenretikulozytenlysate (unbehandelt; Promega; Madison, WI, USA) und Transportpuffer (TP) (20 mM Hepes, 110 mM Kaliumacetat, 5 mM Natriumacetat, 2 mM Magnesiumacetat, 1 mM Ethylenglykoltetraacetat (EGTA), dem jeweils frisch 2 mM DTT, 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin und 1 µg/ml Pepstatin (Roche; Mannheim) zugegeben wurde. Das Kaninchenretikulozytenlysate und der TP wurden 1:1 gemischt und 5 mM Kreatinphosphat, 1 mM ATP und 20 U/ml Kreatinphosphokinase zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 4 h bei 37°C.

2.10 Durchflußzytometrie

Die Zellkerne wurden mittels Zwei-Farben-Durchflußzytometrie analysiert. Hierzu wurden die Zellkerne zweimal mit PBS gewaschen (5 min bei 300 x g) und mit dem Fluoreszenzfarbstoff PI (3 µg/ml in PBS) für 3 min angefärbt. Anschließend wurden die Zellkerne in 1 ml PBS aufgenommen und in einem Durchflußzytometer (Calibur; Becton Dickinson, Heidelberg) analysiert. Berechnungen wurden mittels der CellQuest 3.1 f Analyse-Software (Becton Dickinson; Heidelberg) erstellt. Um den Prozentsatz der EGFP-positiven Zellkerne zu bestimmen, wurden die Zellkerne anhand folgender Parameter analysiert:

Vorwärtstreulicht (FSC = „Forward Angle Light Scatter“), das mit der Größe der Zellkerne korreliert,

Seitwärtsstreulicht (SSC = „Side Angle Light Scatter“), das mit der Granularität der Untersuchungsobjekte korreliert und schließlich der Fluoreszenzeigenschaften; rote Fluoreszenz zeigen alle Zellkerne aufgrund der Anfärbung mit PI, grüne Fluoreszenz zeigen nur solche, die EGFP exprimieren.

2.11 Southern Blot Analyse

Das Plasmid pEGFP_{Luc} und Genvektorkomplexe bestehend aus dem Plasmid pEGFP_{Luc} und B-PEI, L-PEI und PLL wurden wie unter 2.9 „Studien an isolierten Zellkernen“ beschrieben inkubiert. Um zu zeigen, dass es prinzipiell möglich ist die DNA aus den Komplexen herauszulösen, wurden 70 ng Heparansulfat/ng DNA zugegeben und nach einer vorangegangenen Inkubation von 3,45 h für weitere 15 min bei 37°C inkubiert.

Nach der Inkubation wurden 0,1 µg DNA jedes Ansatzes auf einem 1 %igen Agarose-Gel aufgetrennt. Nach Depurinierung (250 mM HCl; ca. 10 min), Denaturierung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl; 2 x 15 min) und Neutralisierung (0,5 M Tris-HCl, pH 7,5, 1,5 M NaCl; 2 x 15 min) wurde das Gel in 20 x SSC-Puffer (175,3 g Natriumchlorid, 88,2 g Natriumcitrat ad 1 l H₂O; pH = 7,0) ca. 10 min äquilibriert. Anschließend folgte der Transfer der DNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche; Penzberg) mittels Kapillarblot (Schleicher & Schuell Bioscience GmbH; Dassel) in 20 x SSC über Nacht.

Mittels des „PCR DIG probe synthesis kit“ (Roche; Penzberg) wurde eine mit Digoxigenin (DIG) markierte 264 bp große Sonde gegen das Plasmid pEGFP_{Luc} hergestellt. Folgende Primer wurden benutzt:

5' – TGGTTTGTCCAAACTCATCAA – 3'

5' – CGTTGGAGTCCACGTTCTTT – 3'

Die Hybridisierung der Sonde mit dem Plasmid erfolgte in „DIG Easy Hyb Buffer“ bei 39°C über Nacht. Es wurden 3 µl/ml der Probe eingesetzt. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte unter Verwendung des „DIG Wash and Block Buffer Set“, „anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments“ und „CDP-Star solution“ (alles Roche; Penzberg). Die Signale wurden schließlich auf einem Röntgenfilm (HyperfilmTM/Amersham Biosciences; Buckinghamshire, UK) erfasst.

2.12 Mikroskopie

2.12.1 Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie wurde freundlicherweise von Herrn J. Lausier durchgeführt. Nach der Magnetofektion bzw. der Inkubation mit transMAG^{PEI}-Partikeln wurden die Zellen mit Sorensens Puffer (0,1 M KH₂PO₄, 0,1 M Na₂HPO₄, pH 7,4) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 % Glutaraldehyd in Sorensens Puffer für 1 h bei RT fixiert. Nach der Fixierung der Zellen wurden sie mit Sorensens Puffer gewaschen. Danach wurden die Zellen in 1 % wässriger Osmiumtetroxid-Lösung für 1 h postfixiert und zweimal mit Sorensens Puffer gewaschen. Es folgte eine Dehydratationsserie in Ethanol mit steigender Konzentration (30 %, 50 % und 70 %). Jeder Schritt wurde zweimal für 10 min durchgeführt. Die Proben wurden über Nacht in 70 % Ethanol bei 4°C gelagert. Am folgenden Tag wurden die Zellen weiter in 90 %, 95 %, und dreimal in 100 % Ethanol bei 4°C dehydriert. Ein zusätzlicher 100 % Ethanol Schritt erfolgte bei RT. Anschließend wurde eine 1:1 Mischung des Epoxidharzes Epon 812 und 100 % Ethanol für 2 h auf die Zellen gegeben. Die Lösung wurde wieder entfernt und reine Epon-Lösung wurde über Nacht auf die Objektträger gegeben. Am folgenden Tag wurde die Epon-Lösung entfernt, zweimal durch neue Epon-Lösung ersetzt und in einem Ofen bei 50°C für 2 Tage zur Polymerisation inkubiert. Mit einem Ultramicrotom wurden Schnitte aus den polymerisierten Blöcken angefertigt. Zur Gegenfärbung wurde 4 % Uranylacetat und 0,2 % Bleicitrat verwendet. Für die elektronenmikroskopische Untersuchung der Präparate wurde ein Philips CM 10 Transmissionselektronenmikroskop benutzt.

2.12.2 Epifluoreszenzmikroskopie

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd (pH 7,4) für 10 min fixiert, mit PBS gewaschen und zum Schutz vor Ausbleichen mit einem „Mounting medium“ bedeckt (vectashield®/Vector Laboratories Inc.; Burlingame, CA, USA). Es wurde ein Epifluorescence Axiovert 135 Mikroskop (Zeiss; Jena) mit einem 20 x, 63 x bzw. einem 100 x / 1,30 oil plan-neofluor Objektiv (Zeiss; Jena) benutzt. Aufnahmen wurden mit einer Digitalkamera angefertigt und mit dem Programm Axiovision 3.0 (Zeiss; Jena) bzw. Adobe Photoshop 6.0 bearbeitet.

2.12.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Für die konfokalen Aufnahmen wurden die Präparate wie unter 2.12.2 Epifluoreszenzmikroskopie beschrieben vorbereitet. Es wurde ein Leica TCS 4D konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (Leica; Solms, Deutschland) verwendet, das mit einem Argon-Krypton Laser ausgestattet ist. Das verwendete Objektiv ist ein PL APO, 63 x / 1,32 – 0,6 Öl Objektiv (Leica; Solms, Deutschland). Die Aufnahmen wurden mit Adobe Photoshop 6.0 bearbeitet.

2.13 Statistische Auswertungen

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt. Signifikanzen wurden mit dem t-Test für unverbundene Stichproben ermittelt. Falls nicht anders angegeben wurden die Experimente jeweils dreimal durchgeführt, wobei die einzelnen Bedingungen als Triplikate oder Quadruplikate gemessen wurden. Messergebnisse wurden als signifikant unterschiedlich angesehen, wenn $p \leq 0,05$. Die statistischen Analysen wurden mit dem Programm StatView 5.0 (SAS Institute Inc.; Cary, NC, USA) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Mechanismus der Magnetofektion

3.1.1 Die zelluläre Aufnahme und der intrazelluläre Transport von transMAG^{PEI}-Partikeln

Zunächst wurden die zelluläre Aufnahme und der intrazelluläre Transport von transMAG^{PEI}-Partikeln untersucht. Hierzu wurden HeLa Zellen mit transMAG^{PEI}-Partikeln inkubiert und für 1 min, 5 min und 15 min einem magnetischen Feld (FeNdB-Dauermagnet) ausgesetzt. Anschließend wurden von den Zellen elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Bereits nach 1 min kann man einige Partikel in unmittelbarer Nähe zu den Zellen beobachten (Abb. 8a). Nach 5 min akkumulieren die Partikel an der Zelloberfläche (Abb. 8b), und nach 15 min kann man Partikel innerhalb der Zelle beobachten (Abb. 8c). Von einem Teil der Zellen, die für 15 min dem magnetischen Feld ausgesetzt wurden, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen nach einer weiteren Inkubation von 24 h ohne Magnetfeld angefertigt. Die längere Inkubationszeit führt zu einer Anreicherung der transMAG^{PEI}-Partikel in abgegrenzten intrazellulären Kompartimenten (Abb. 8d). Die Vergrößerungen der einzelnen Abbildungen (8a bis 8d; Ausschnitte) zeigen, dass die Zellen dort wo die Partikel die Zelloberfläche berühren schmale fingerförmige Ausstülpungen ausbilden. Diese zellulären Ausstülpungen umschliessen die Partikel während der Aufnahme.

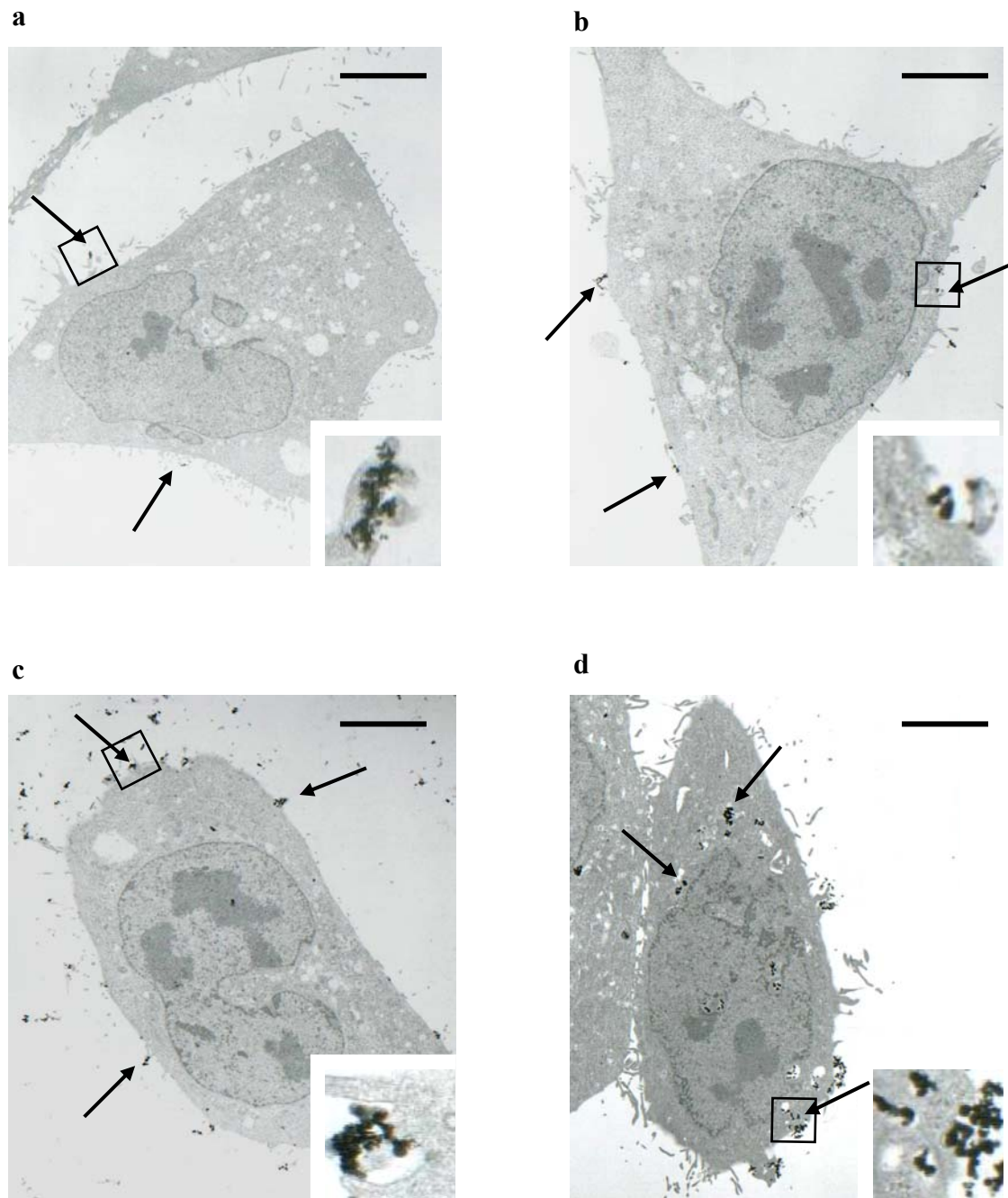


Abbildung 8: **Aufnahme und intrazellulärer Transport von transMAG^{PEI}-Partikeln in HeLa Zellen.** Die Zellen wurden mit transMAG^{PEI}-Partikeln inkubiert und für (a) 1 min, (b) 5 min, (c) 15 min und (d) 15 min mit nachfolgender Inkubation von 24 h (ohne Magnetfeld) einem magnetischen Feld ausgesetzt. Die Pfeile zeigen die transMAG^{PEI}-Partikel.

Messbalken: 5 μm

3.1.2 Die zelluläre Aufnahme und der intrazelluläre Transport von transMAG^{PEI}/DNA-Komplexen

Als Nächstes stellte sich die Frage, ob sich die transMAG^{PEI}/DNA-Komplexe ebenso verhalten wie die transMAG^{PEI}-Partikel. Um den Weg der DNA zu verfolgen wurde diese mit kolloidalem Gold markiert. Abbildung 9 zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen von Gold-markierter DNA (Abb. 9a), transMAG^{PEI}-Partikeln (Abb. 9b) und Komplexen aus Gold-markierter DNA und transMAG^{PEI}-Partikeln (Abb. 9c). Durch die höhere Elektronendichte von Gold kann die DNA im Komplex sichtbar gemacht werden (Abb. 9c). Dies zeigt zum einen, dass die transMAG^{PEI}-Partikel in der Lage sind Komplexe mit der Gold-markierten DNA auszubilden, und zum anderen, dass diese Komplexe für elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Aufnahme von Genvektorkomplexen genutzt werden können.

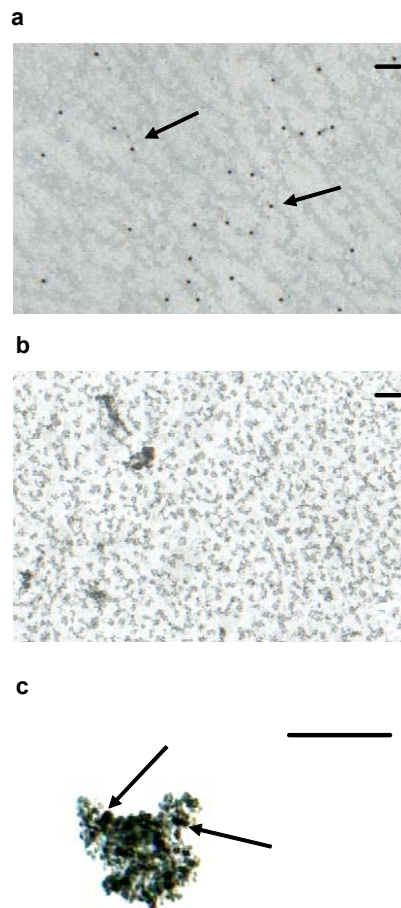
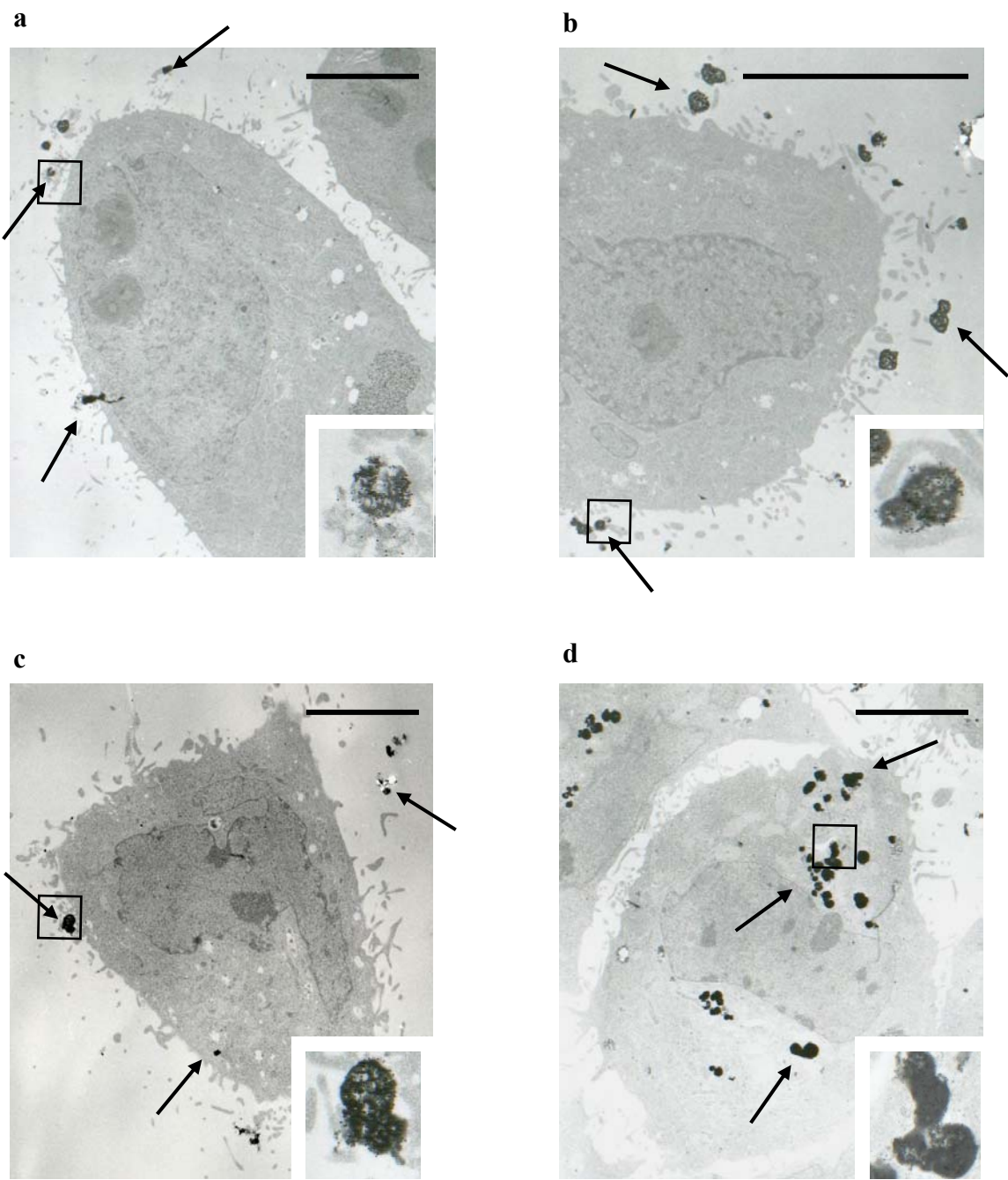


Abbildung 9: **Elektronenmikroskopische Darstellung der einzelnen Komponenten der transMAG^{PEI}/DNA-Komplexe.** (a) Gold-markierte DNA, (b) transMAG^{PEI}-Partikel und (c) mit Gold-markierter DNA komplexierte transMAG^{PEI}-Partikel. Die Pfeile zeigen die Gold-markierte DNA.

Messbalken: 100 nm (a, b) und 200 nm (c)

Um nun die zelluläre Aufnahme und den intrazellulären Transport von transMAG^{PEI}/DNA-Komplexen zu untersuchen, wurden HeLa Zellen mit transMAG^{PEI}/DNA-Komplexen transfiziert und für 1 min, 5 min, 15 min und 15 min mit nachfolgender Inkubation von 24 h ohne Magnetfeld, einem magnetischen Feld ausgesetzt. Anschließend wurden von den Zellen elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt (Abb. 10). Die Zellen bilden zahlreiche fingerförmige Ausstülpungen aus, die wie schon zuvor bei der Inkubation mit den transMAG^{PEI}-Partikeln in den Aufnahmeprozess involviert zu sein scheinen. Nach 1 min sind einige wenige Komplexe in der Nähe der Zelloberfläche zu sehen (Abb. 10a). Bereits nach 5 min hat die Anzahl der Komplexe nahe der Zelloberfläche zugenommen (Abb. 10b). Der vergrößerte Ausschnitt aus Abbildung 10c zeigt einen Komplex der zum Zeitpunkt der elektronenmikroskopischen Aufnahme von der Zelle aufgenommen wurde. In Abbildung 10d, nach 15 min mit anschließender Inkubation von 24 h ohne Magnetfeld, sind schließlich einige Komplexe innerhalb der Zelle zu sehen. Durch die Goldmarkierung der DNA lässt sich zeigen, dass die transMAG^{PEI}-Partikel und die DNA als Komplexe internalisiert wurden. In Abbildung 10e ist eine weitere Vergrößerung der Abbildung 10c zu sehen. Sie zeigt endozytotische Vesikel, genauer gesagt ein „Clathrin coated pit“ und ein Caveola. Das „Clathrin coated pit“ ist durch seinen Mantel aus dem Protein Clathrin, das eine höhere Elektronendichte als der Rest des Vesikels besitzt, gekennzeichnet.



e

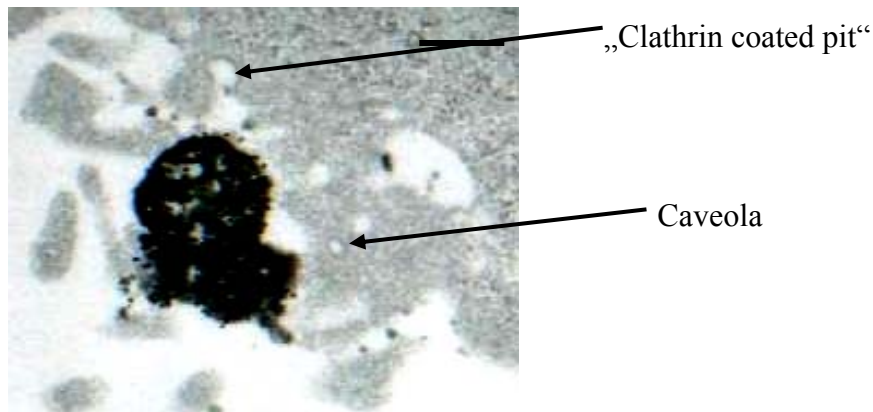


Abbildung 10: **Aufnahme und intrazellulärer Transport von transMAG^{PEI}/DNA-Komplexen in HeLa Zellen.** Die Zellen wurden mit transMAG^{PEI}/DNA-Komplexen (die DNA wurde Gold-markiert) transfiziert und für (a) 1 min, (b) 5 min, (c) 15 min und (d) 15 min mit nachfolgender Inkubation von 24 h (ohne Magnetfeld) einem magnetischen Feld ausgesetzt. Abb. 10e zeigt ein „Clathrin coated pit“ und ein Caveola. Die Pfeile zeigen die transMAG^{PEI}/DNA-Komplexe.

Messbalken: 5 μm (a, b, c, d) und 200 nm (e)

3.1.3 Einfluss von Endozytoseinhibitoren auf die Effizienz von Magnetofektion bzw.

Transfektion

Als Nächstes sollte der Mechanismus der Aufnahme von Genvektorkomplexen genauer charakterisiert werden, als dies mit Hilfe der elektronenmikroskopischen Aufnahmen möglich war. Hierzu wurden Magnetofektionen bzw. Transfektionen in Anwesenheit von Endozytoseinhibitoren durchgeführt. Da es eventuell Unterschiede in der Genvektorkomplexaufnahme zwischen verschiedenen Gewebetypen gibt, wurden Zelllinien aus unterschiedlichen Organen, nämlich HeLa, BEAS-2B und Hep-G2 Zellen verwendet.

Die Magnetofektion von HeLa Zellen (Abb. 11a) unter Zugabe von Antimycin A, das die Endozytose unspezifisch blockt (Simoes *et al.*, 2001), führte zu einem signifikanten Abfall der Effizienz des Gentransfers im Vergleich zur Kontrolle ohne Inhibitorzugabe. Die Zugabe von Inhibitoren, die auf die Endosomen wirken wie z. B. Chloroquin, das die Endozytose durch Inhibierung der lysosomalen Ansäuerung (Simoes *et al.*, 2001) und Störung des

Transports von den frühen zu den späten Endosomen (Forrest and Pack, 2002) beeinflusst, führte ebenfalls zu einer signifikanten Abnahme der Gentransfereffizienz. Monensin, das die Struktur und Funktion der Lysosomen zerstört (Detilleux *et al.*, 1991; Tammi *et al.*, 2001), hatte keinen Einfluss auf die Gentransfereffizienz. Auf die Ausbildung der Caveolae wirken Progesteron, Nystatin und PMA inhibierend (Schnitzer *et al.*, 1994; Smart *et al.*, 1995; Smart *et al.*, 1994; Tammi *et al.*, 2001). Die Zugabe jedes dieser Inhibitoren führte zu einem signifikanten Abfall der Gentransfereffizienz. Auch das Zytoskelett, also Mikrotubuli und Aktinfilamente, sind in den Endozytoseprozess involviert. Daher wurden auch Inhibitoren getestet, die auf das Zytoskelett einwirken. Colchizin, das die Mikrotubuli zerstört (Durrbach *et al.*, 1996), führte zu einem signifikanten Abfall der Gentransfereffizienz. Den gleichen Effekt erreichte man durch Zugabe von Nocodazol, das zu einer Depolymerisierung der Mikrotubuli führt (Hasegawa *et al.*, 2001). In der Anwesenheit von Taxol, das die Mikrotubuli stabilisiert (Hasegawa *et al.*, 2001), blieb die Gentransfereffizienz im Vergleich zur Kontrolle unverändert. Cytochalasin B, das filamentöses Aktin abbaut (Durrbach *et al.*, 1996; Matsui *et al.*, 1997), verursachte eine leichte Abnahme der Gentransfereffizienz, die jedoch nicht signifikant war.

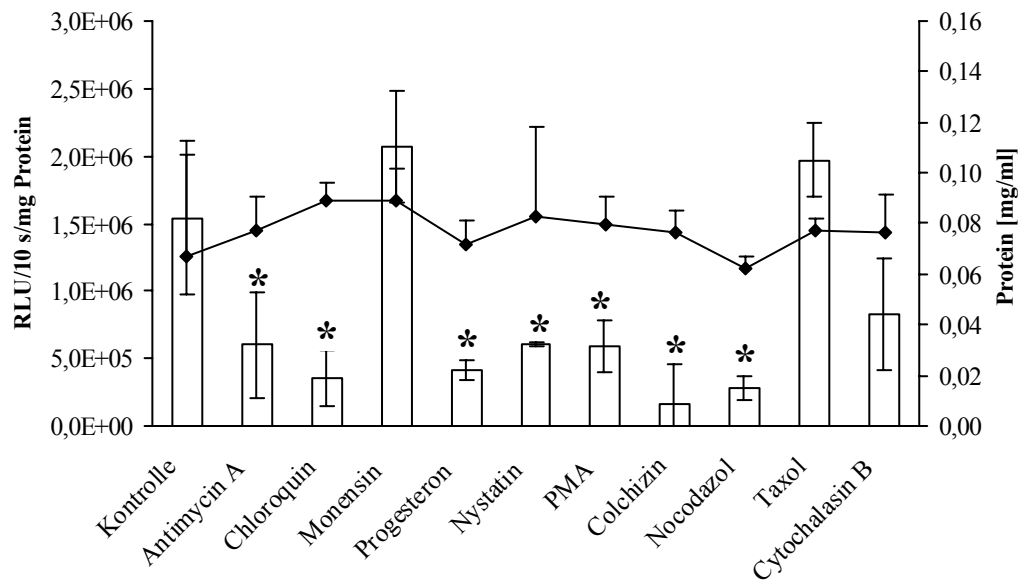
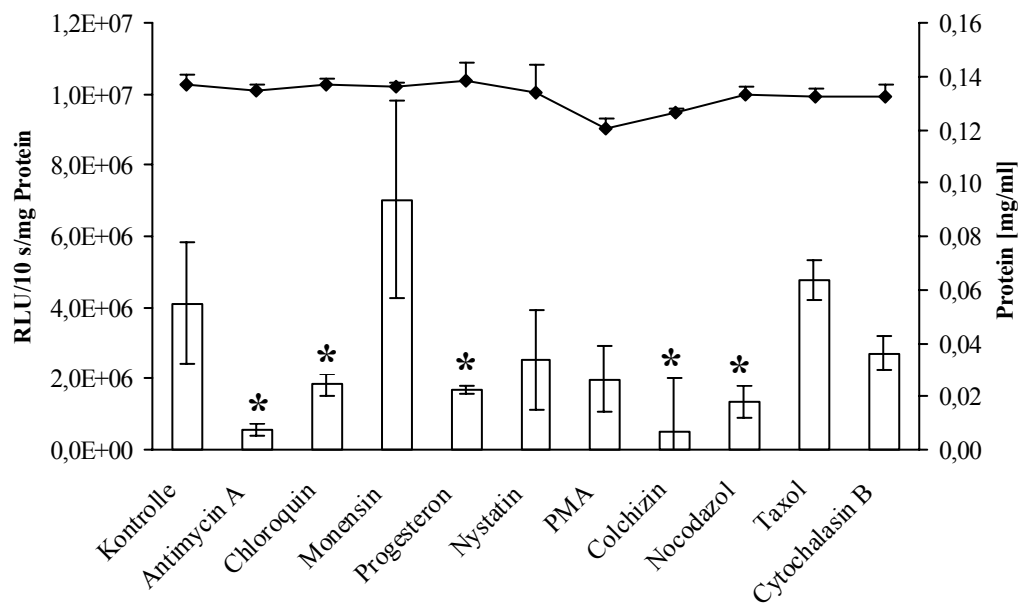
In einem nächsten Experiment sollte geklärt werden, ob sich die Magnetofektion von der Transfektion mit auf PEI basierenden Genvektorkomplexen unterscheidet. Dazu wurden HeLa Zellen unter den gleichen Bedingungen wie zuvor beschrieben, unter Zugabe von Endozytoseinhibitoren, mit auf B-PEI basierenden Genvektorkomplexen transfiziert. Die Gentransfereffizienz wurde durch die Endozytoseinhibitoren in derselben Art und Weise beeinflusst wie bei der Magnetofektion (Abb. 11b).

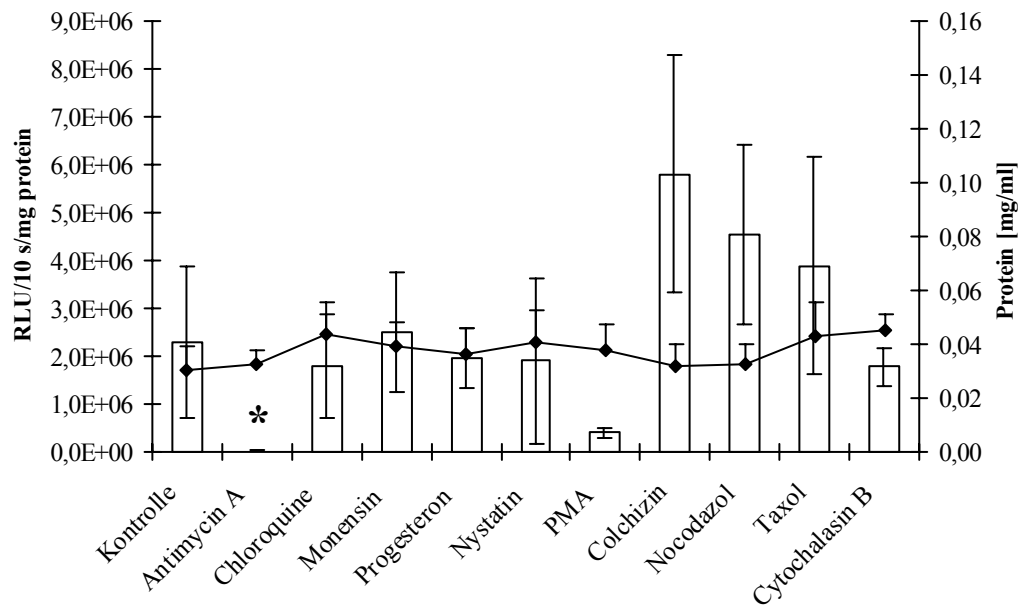
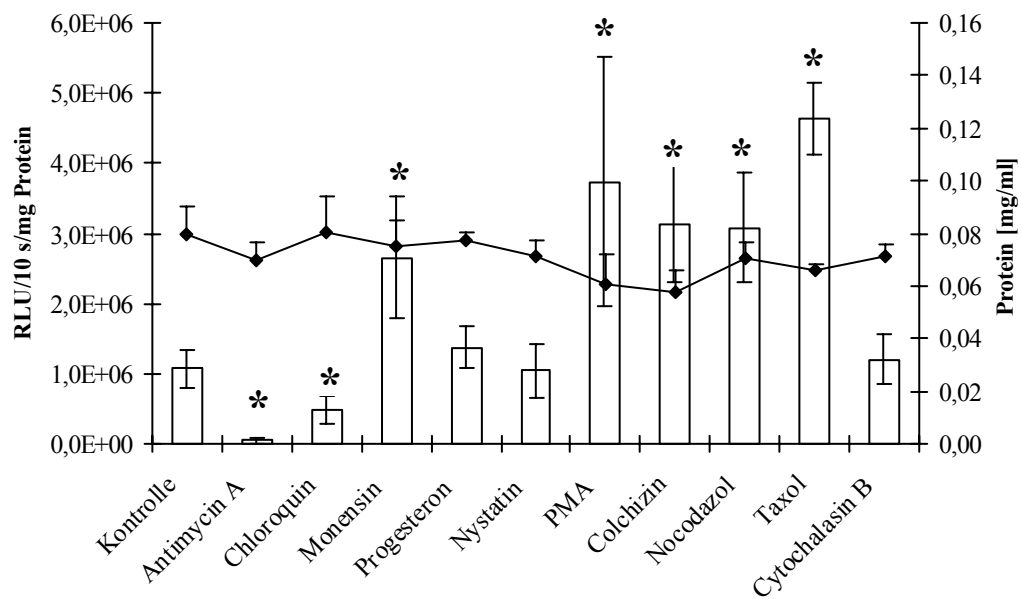
Als Nächstes wurden Magnetofektion und Transfektion von BEAS-2B Zellen verglichen. Das Muster des Einflusses der Endozytoseinhibitoren auf die Gentransfereffizienz unterschied sich hier von dem der HeLa Zellen. In BEAS-2B Zellen wurde bei der Magnetofektion (Abb. 11c) die Gentransfereffizienz unter Zugabe von Monensin und Progesteron nicht verändert, die Zugabe von Colchizin und Nocodazol führte zu einer gesteigerten Gentransfereffizienz – diese beiden Inhibitoren führten in HeLa Zellen zu einer Abnahme der Effizienz. Nur die Zugabe von Antimycin A führte zu einer signifikanten Änderung, hier einer Abnahme der Gentransfereffizienz. Die Transfektion von BEAS-2B Zellen (Abb. 11d) zeigte das gleiche Muster an Gentransfereffizienzen wie es für die Magnetofektion beobachtet wurde, mit Ausnahme von PMA, das zu einer signifikanten Steigerung der Gentransfereffizienz führte.

Schließlich wurden Magnetofektion und Transfektion von Hep-G2 Zellen verglichen. Die Effizienz der Magnetofektion von Hep-G2 Zellen (Abb. 11e) zeigte ein ähnliches Muster wie

es zuvor für HeLa Zellen beobachtet wurde, mit Ausnahme der Inhibitoren für die Ausbildung der Caveolae, die hier nicht zu einem Abfall der Gentransfereffizienz führten. Für die Transfektion der Hep-G2 Zellen (Abb. 11f) gilt, dass der Einfluss der Endozytoseinhibitoren zu ähnlichen Ergebnissen führte wie sie für die HeLa Zellen beobachtet wurden.

Die Ergebnisse des Zellproliferationstests (Abb. 12) wie schon zuvor die Werte für den Proteingehalt der Zellen (Abb. 11) zeigten, dass die Endozytoseinhibitoren keinen toxischen Effekt auf die Zellen ausübten. Als einzige Ausnahme zeigten die BEAS-2B Zellen eine signifikant reduzierte Zellvitalität nach der Zugabe von Antimycin A (Abb. 12b).

a Magnetofektion**b Transfektion**

c Magnetofektion**d Transfektion**

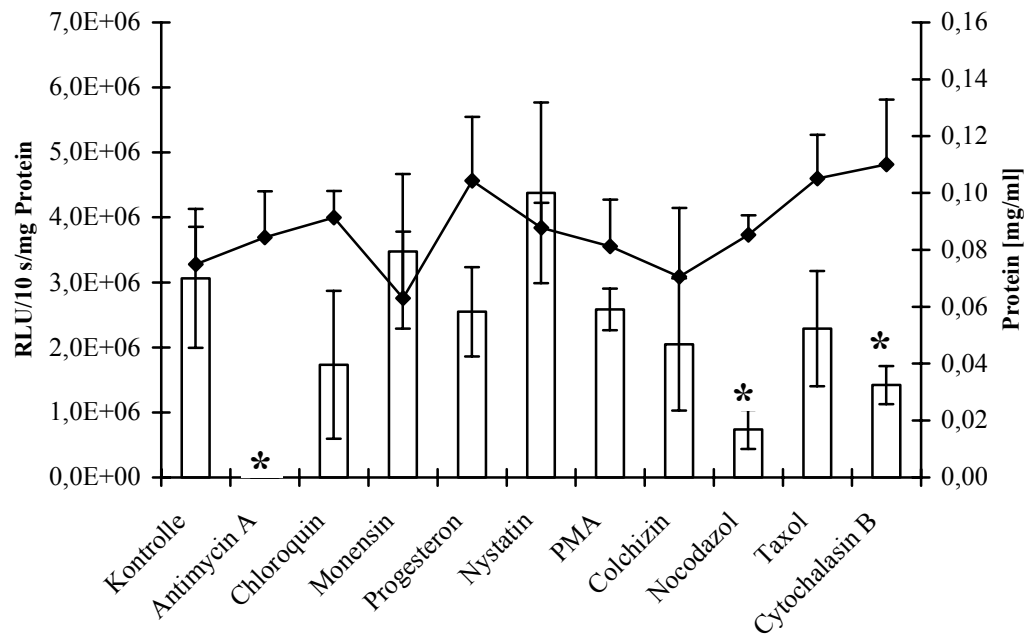
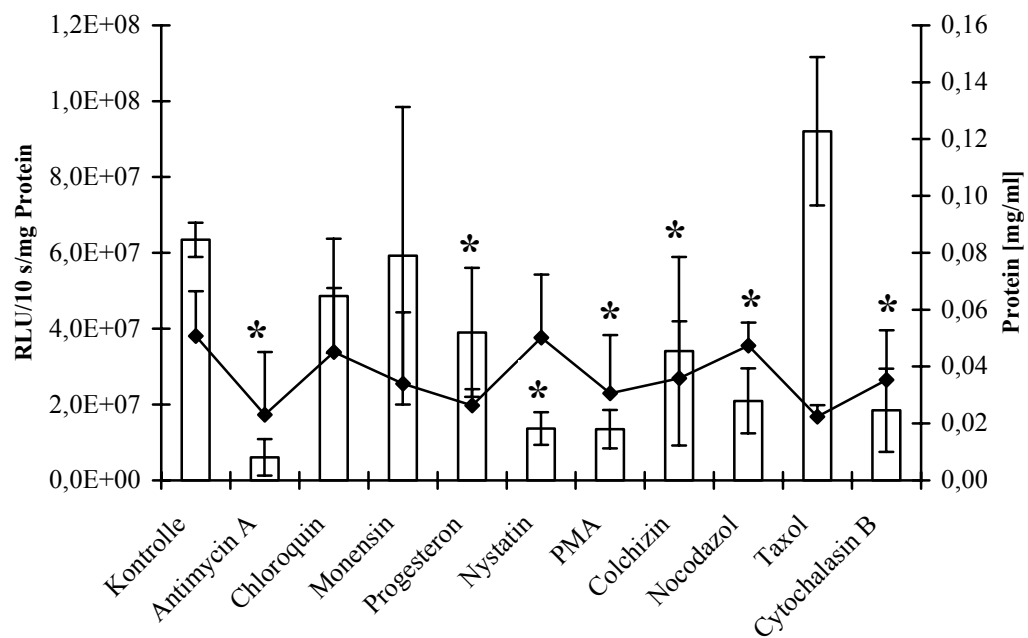
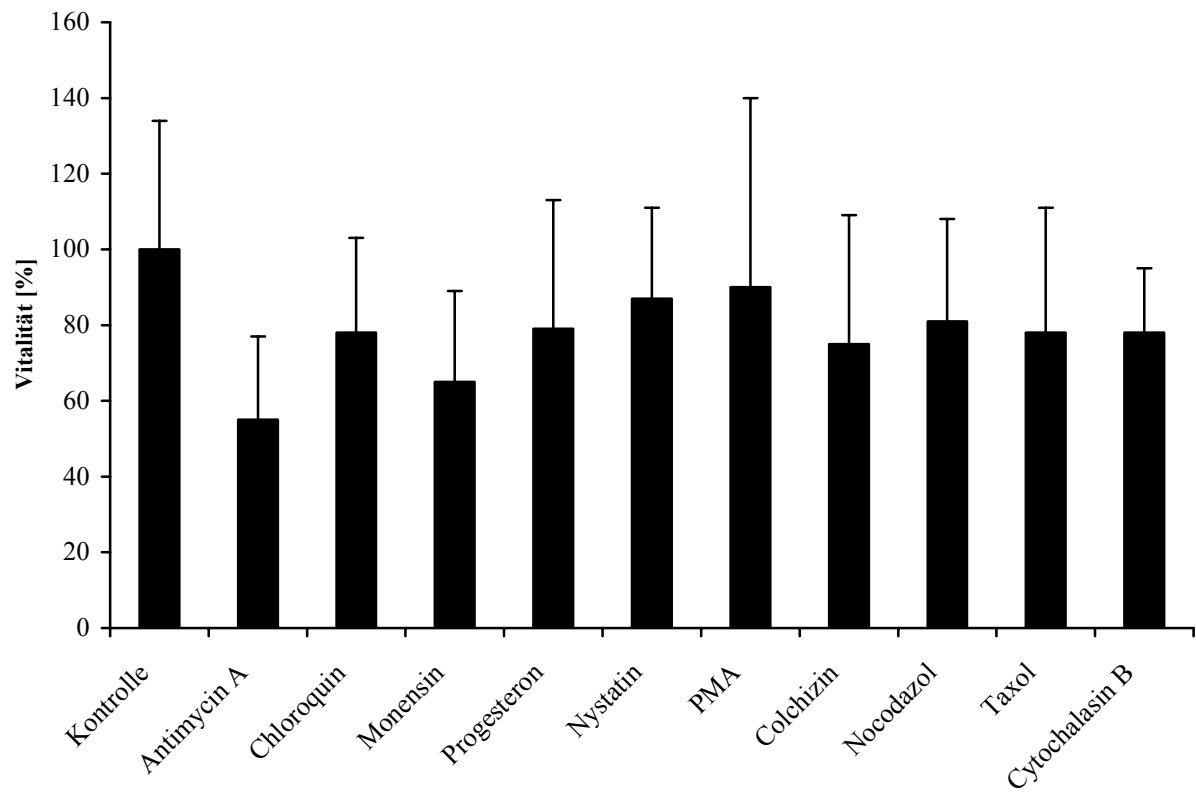
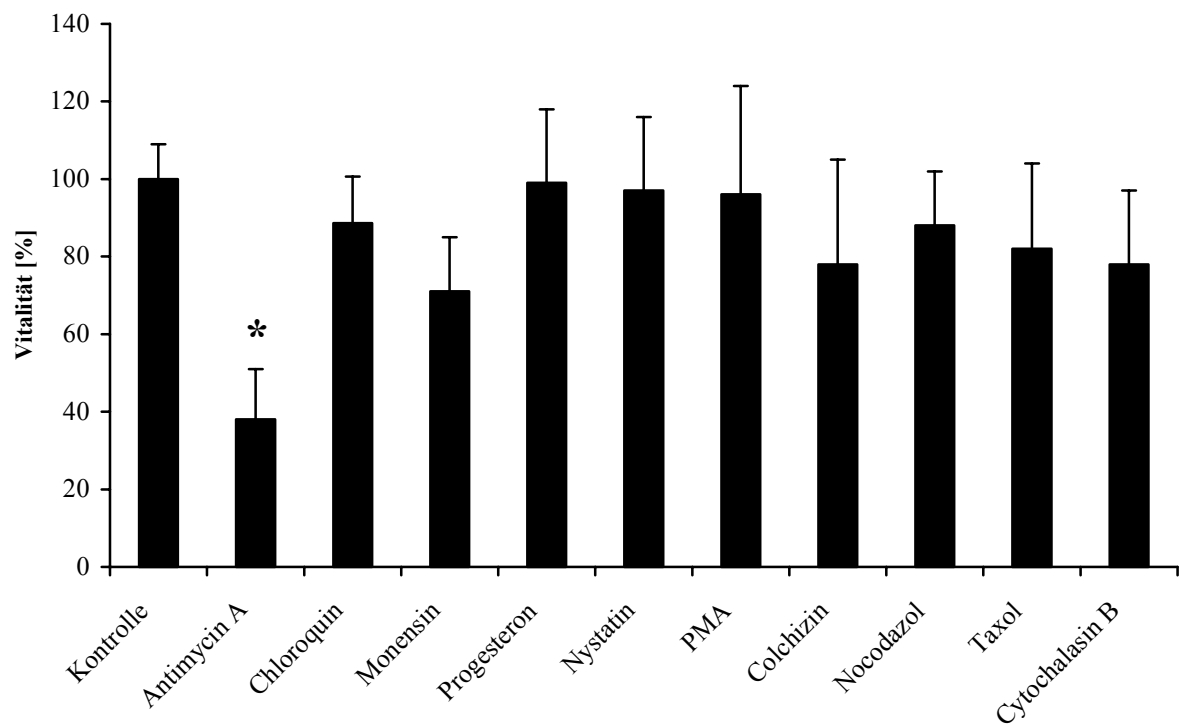
e Magnetofektion**f Transfektion**

Abbildung 11: Wirkung verschiedener Endozytoseinhibitoren auf die Gentransfereffizienz in HeLa, BEAS-2B und Hep-G2 Zellen. (a, c, e) Magnetofektion mit trans MAG^{PEI}/DNA-Komplexen; (a) HeLa, (c) BEAS-2B und (e) Hep-G2 Zellen. (b, d, f) Transfektion mit Genvektorkomplexen, die auf B-PEI basieren; (b) HeLa, (d) BEAS-2B und (f) Hep-G2 Zellen. Die Säulen repräsentieren die Gentransfereffizienz bezogen auf die Expression von Luziferase, der Graph zeigt die Proteinkonzentration.

* Werte, die sich signifikant von der Kontrolle unterscheiden ($p \leq 0,05$; $n = 4$). Jedes Diagramm zeigt ein repräsentatives Experiment. Die Experimente wurden jeweils dreimal durchgeführt.

a**b**

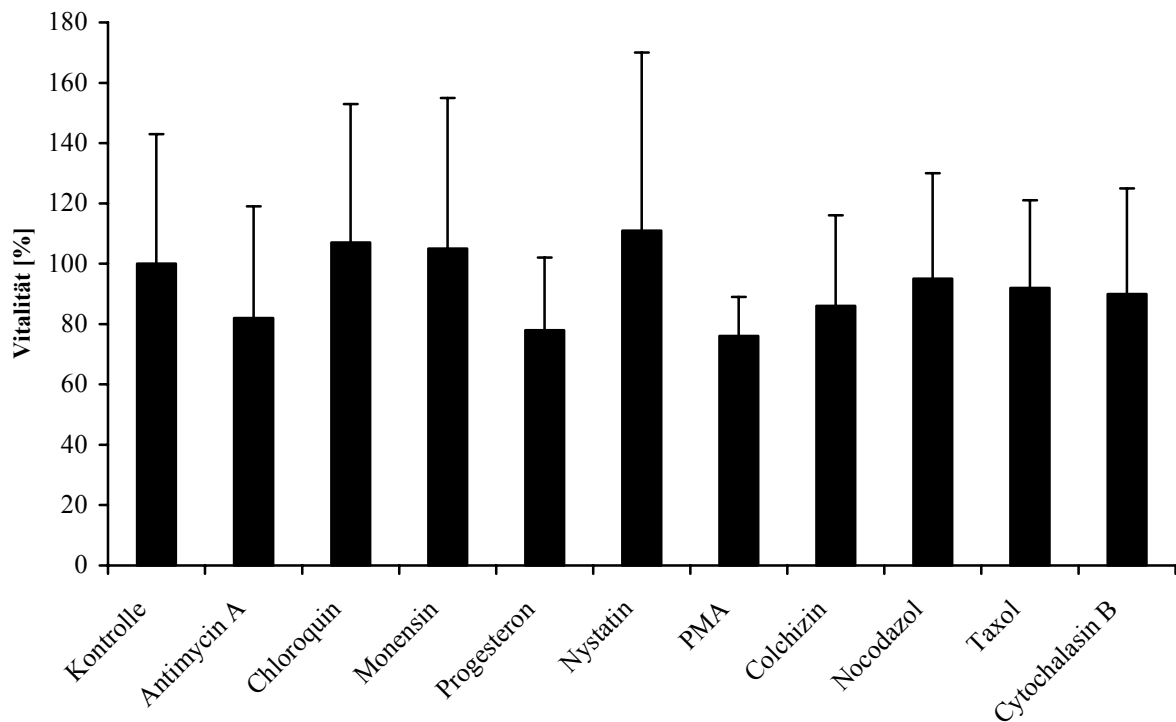
c

Abbildung 12: **Toxizität der Endozytoseinhibitoren.** Die Bestimmung der Vitalitätsrate basiert auf der Konzentration von ATP in den Zellen. (a) HeLa, (b) BEAS-2B und (c) Hep-G2 zellen.

* Werte, die sich signifikant von der Kontrolle unterscheiden ($p \leq 0,05$; $n = 4$). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten angegeben.

3.1.4 Endozytoseaktivität der ausgewählten Zelllinien

Die Fähigkeit der ausgewählten Zelllinien sowohl zur Clathrin-vermittelten, als auch zur Endozytose über Caveolae wurde durch Inkubation der Zellen mit entsprechenden Endozytosemarkern nachgewiesen. Als positiver Marker für Clathrin-vermittelte Endozytose wurde FITC-markiertes Transferrin-Polylysin verwendet. Alexa Fluor® 594 Cholera Toxin Untereinheit B (CT-B) Konjugat wurde als positiver Marker für Caveolae-vermittelte Endozytose eingesetzt. Die Fluoreszenzbilder (Abb. 13) zeigen, dass die drei untersuchten Zelllinien, HeLa (Abb. 13a), BEAS-2B (Abb. 13b) und Hep-G2 (Abb. 13c) die Fähigkeit besaßen sowohl Clathrin-, als auch Caveolae-vermittelte Endozytose zu betreiben. Die verschiedenen Vesikel sind deutlich zu erkennen und gleichmäßig über die Zellen verteilt. Eine Überlappung der Signale ist nicht zu erkennen. Offensichtlich gibt es mehr Caveolae als „Clathrin coated pits“. In den Hep-G2 Zellen sind die Caveolae eher am Rand der Zellen lokalisiert.

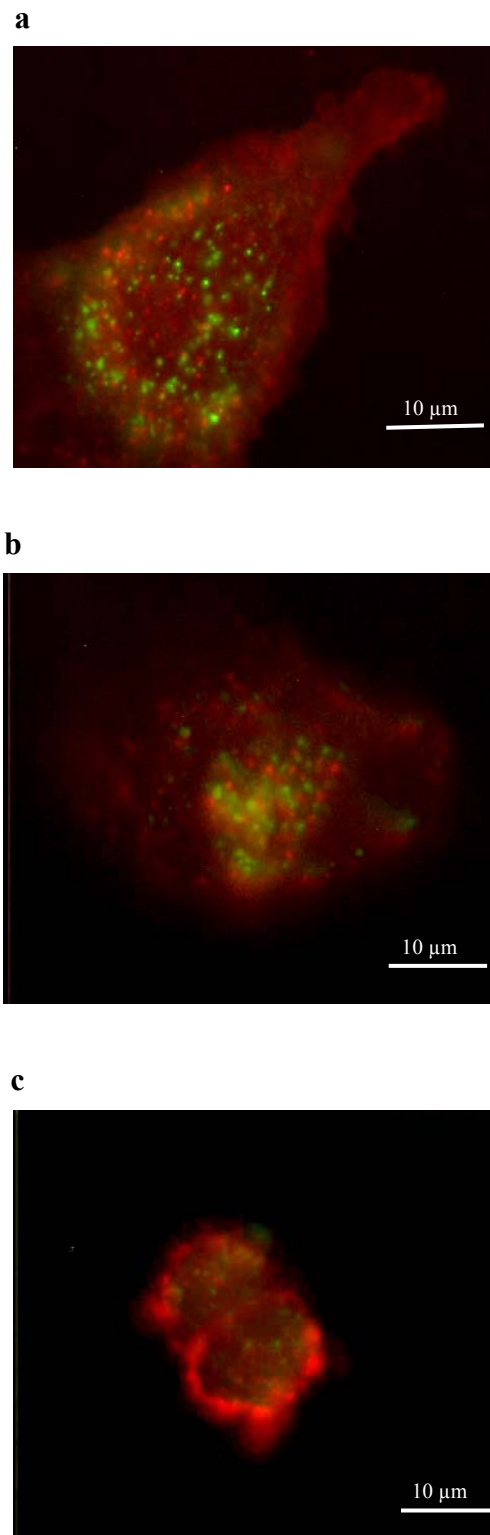


Abbildung 13: **Endozytotische Aktivität der ausgewählten Zelllinien.** FITC-markiertes Transferrin-Polylysine (grünes Fluoreszenzsignal) wurde als Marker für Clathrin-vermittelte Endozytose eingesetzt, Alexa Fluor 594 Cholera Toxin Untereinheit B (CT-B) Konjugat (rotes Fluoreszenzsignal) wurde als Marker für Caveolae-vermittelte Endozytose eingesetzt. Fluoreszenzaufnahmen von (a) HeLa, (b) BEAS-2B und (c) Hep-G2 Zellen.

3.1.5 Einfluss des magnetischen Feldes auf die Gentransfereffizienz von transMAG^{PEI}/DNA-Komplexen

Im folgenden Experiment wurde die Wirkung des magnetischen Feldes auf die Aufnahme der Genvektorkomplexe genauer untersucht. HeLa, BEAS-2B und Hep-G2 Zellen wurden mit transMAG^{PEI}/DNA-Komplexen wie zuvor transfiziert. Anschließend folgte an Stelle des Anlegens eines Magnetfeldes ein Zentrifugationsschritt (10 min, 37°C, 300 g), um die Genvektorkomplexe auf die Zelloberfläche zu sedimentieren. Schließlich wurden die Zellen gewaschen und danach mit und ohne Anlegen eines Magnetfeldes inkubiert (für 0,5 h bei 37°C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit). Das Magnetfeld führte in keiner der getesteten Zelllinien zu einem signifikanten Unterschied der Gentransfereffizienz verglichen mit den Ansätzen ohne Magnetfeld (Abb. 14).

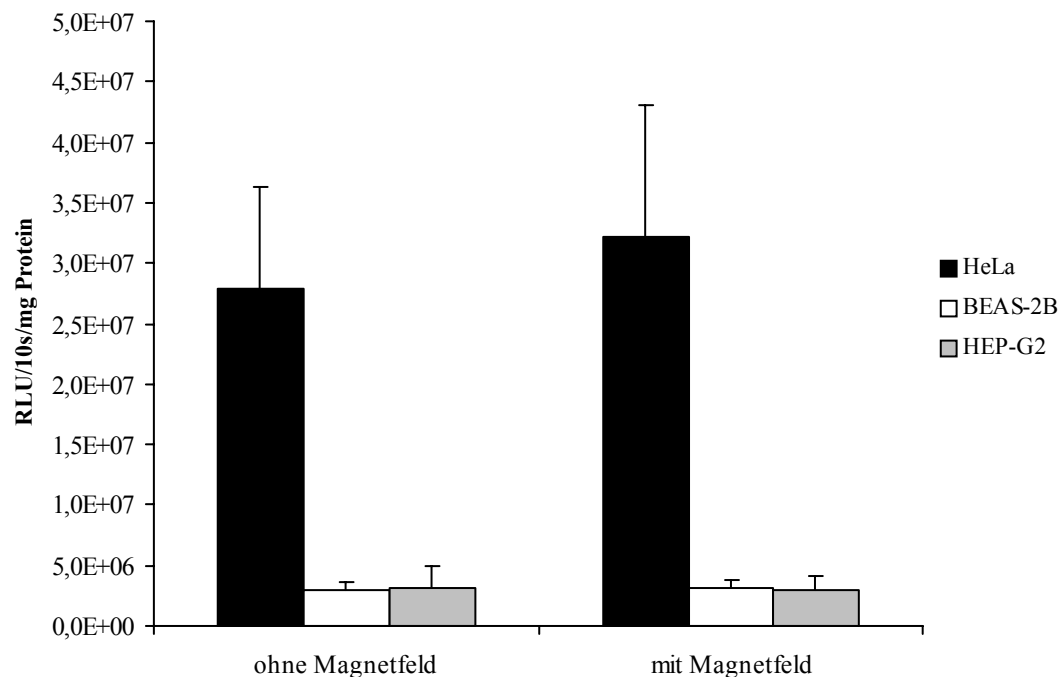


Abbildung 14: **Wirkung des Magnetfeldes auf die zelluläre Aufnahme von transMAG^{PEI}/DNA-Komplexen.** transMAG^{PEI}/DNA-Komplexe wurden zu HeLa, BEAS-2B und Hep-G2 Zellen gegeben und mittels Zentrifugation auf die Zelloberflächen zentrifugiert. Das Diagramm zeigt ein repräsentatives Experiment (n = 12). Das Experiment wurde dreimal durchgeführt.

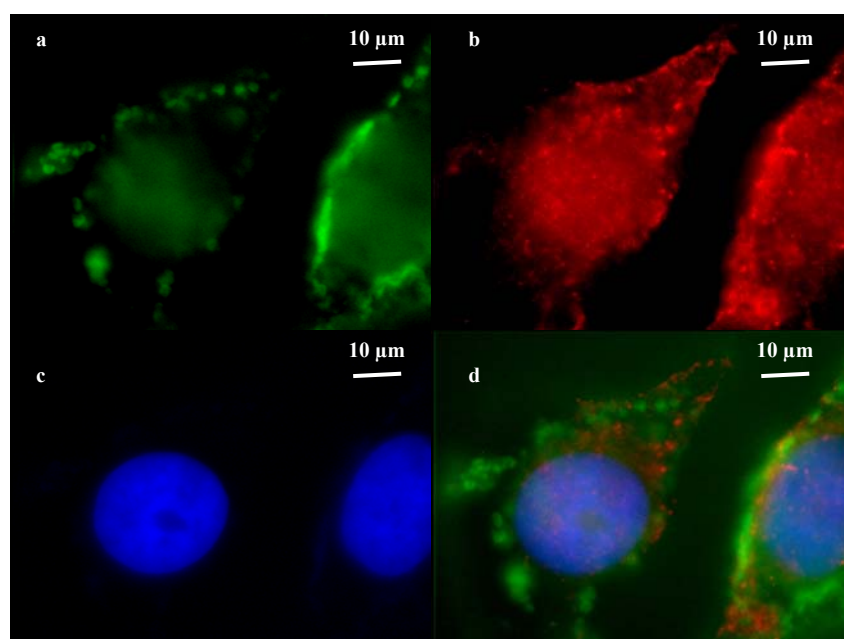
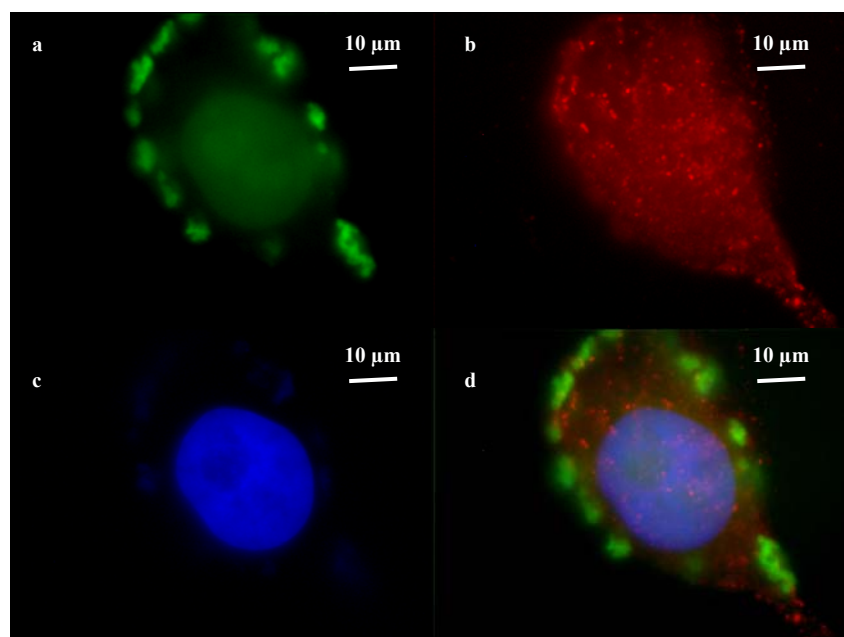
3.2 Die Rolle der Caveolae für die Aufnahme bzw. den intrazellulären Transport von synthetischen Genvektorkomplexen

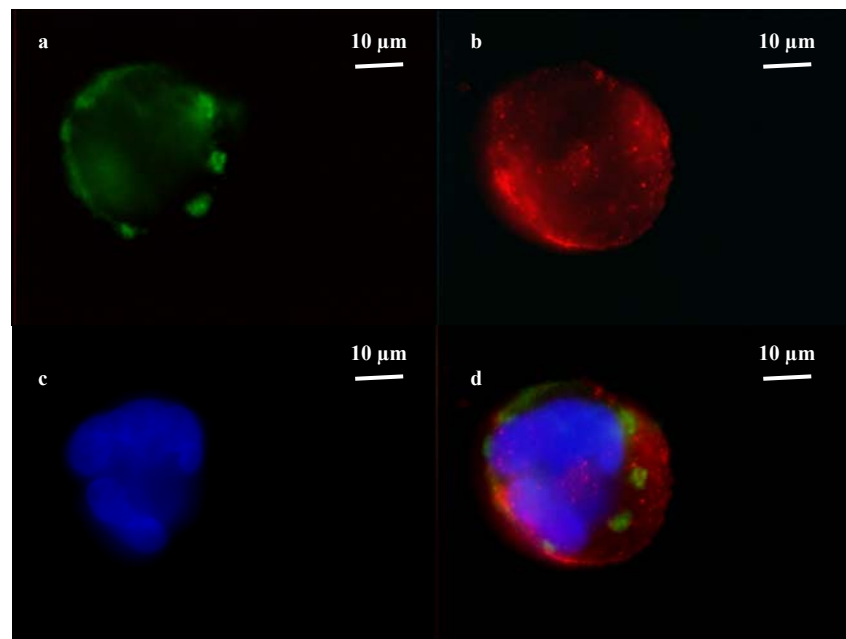
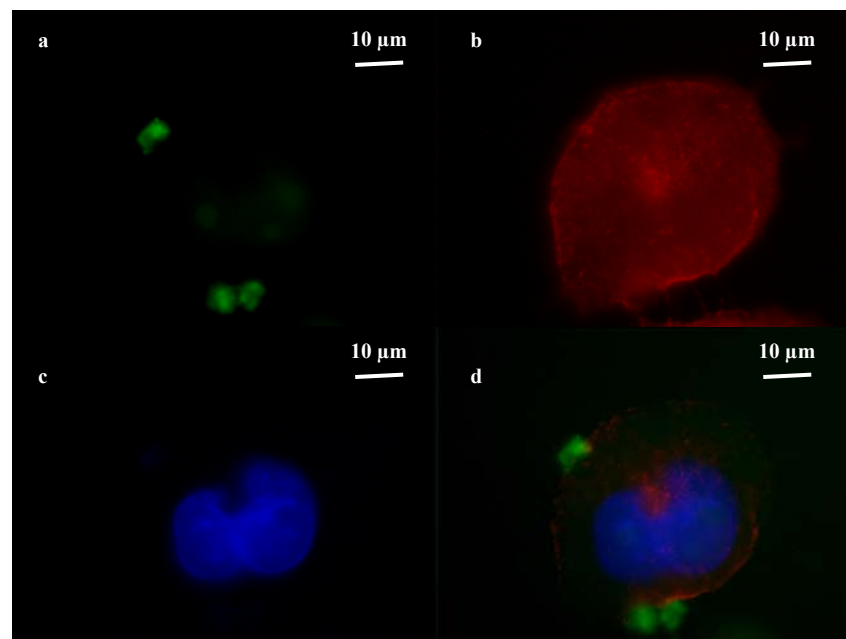
3.2.1 Einfluss von Caveolae-Inhibitoren auf die Gentransfereffizienz *in vitro*

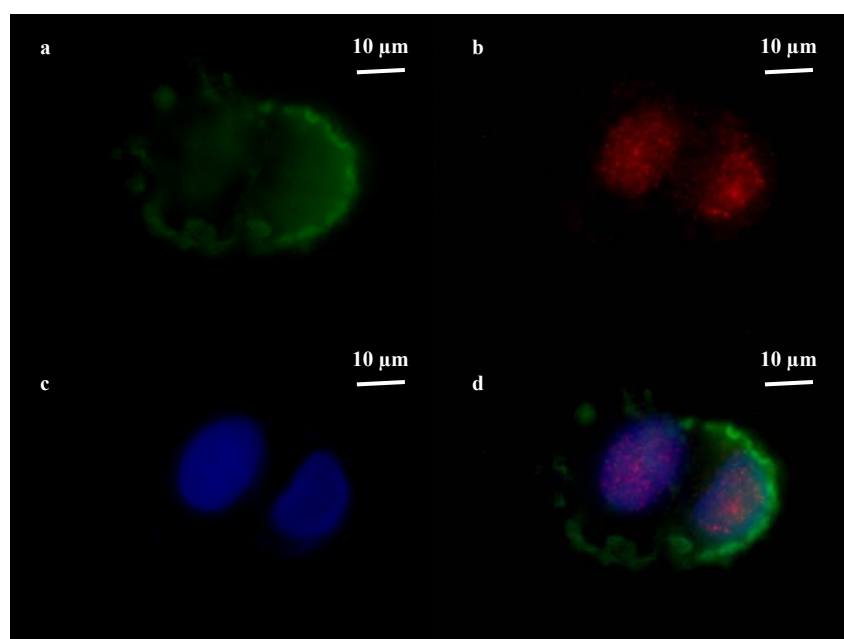
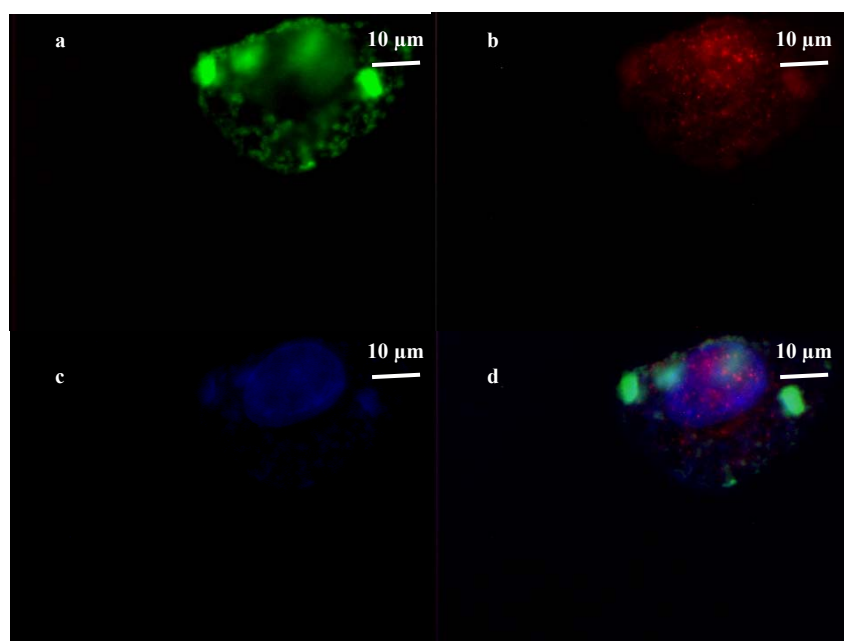
Im vorangegangenen Kapitel wurde die Endozytose mittels spezifischer Inhibitoren gehemmt. Abbildung 11 zeigt, dass die Zugabe von Substanzen, die auf die Ausbildung der Caveolae inhibitorisch wirken (Progesteron, Nystatin und PMA) in der Regel zu einer deutlichen Abnahme der Gentransfereffizienz bei den drei verwendeten Zelllinien HeLa, BEAS-2b und Hep-G2 führt. Dies legt den Schluss nahe, dass die Genvektorkomplexe zumindest teilweise über Caveolae aufgenommen werden.

3.2.2 Untersuchungen zur Kolokalisation der Genvektorkomplexe mit Caveolae *in vitro*

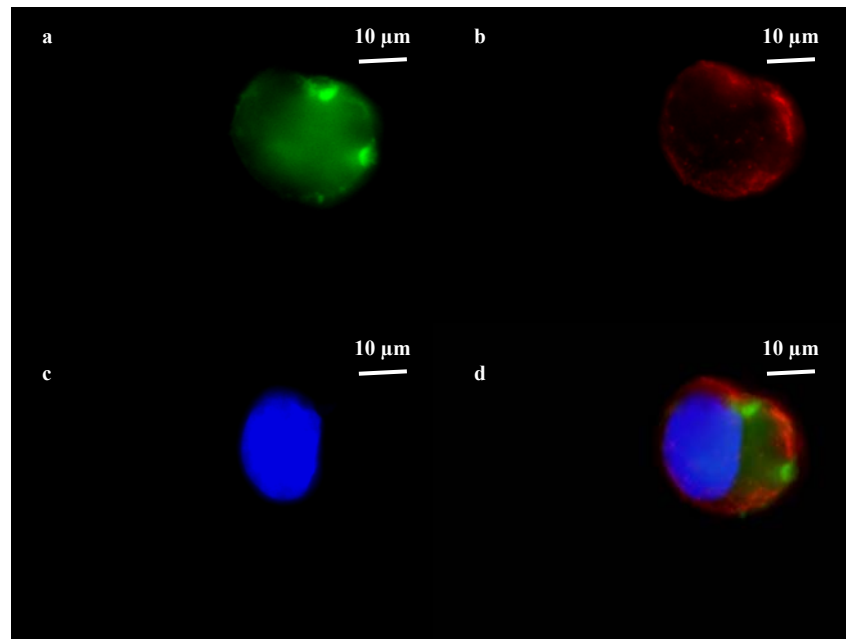
Zum Nachweis einer eventuellen Kolokalisation der Genvektorkomplexe mit Caveolae wurden die bereits zuvor für die Experimente mit den Endozytoseinhibitoren verwendeten Zelllinien HeLa (Abb. 15.I), BEAS-2B (Abb. 15.II) und Hep-G2 (Abb. 15.III), sowie EA.hy 926 Zellen (Abb. 15.IV) untersucht. Letztere entstanden aus der Fusion von HUVEC (Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen) und der permanenten Zelllinie A549 (humanes Lungenkarzinom). Diese Zelllinie ist für das nachfolgende Experiment besonders geeignet, da bekannt ist, dass Caveolae in verstärktem Maße in Endothelzellen und Typ I Pneumozyten vorkommen (Gumbleton *et al.*, 2000). Die Genvektorkomplexe wurden in 5 % Glucose (Abb. 15.A) bzw. in HBS (Abb. 15.B) generiert. Generell lässt sich beobachten, dass die Komplexe in HBS größere Aggregate ausbilden als in 5 % Glucose (Abb. 15a). Des Weiteren sind in allen verwendeten Zelllinien eine Vielzahl an Caveolae zu erkennen (Abb. 15.b). Eine Kolokalisation zwischen Genvektorkomplexen und Caveolae kann jedoch nicht beobachtet werden (Abb. 15.d).

I.A**I.B**

II.A**II.B**

III.A**III.B**

IV.A



IV.B

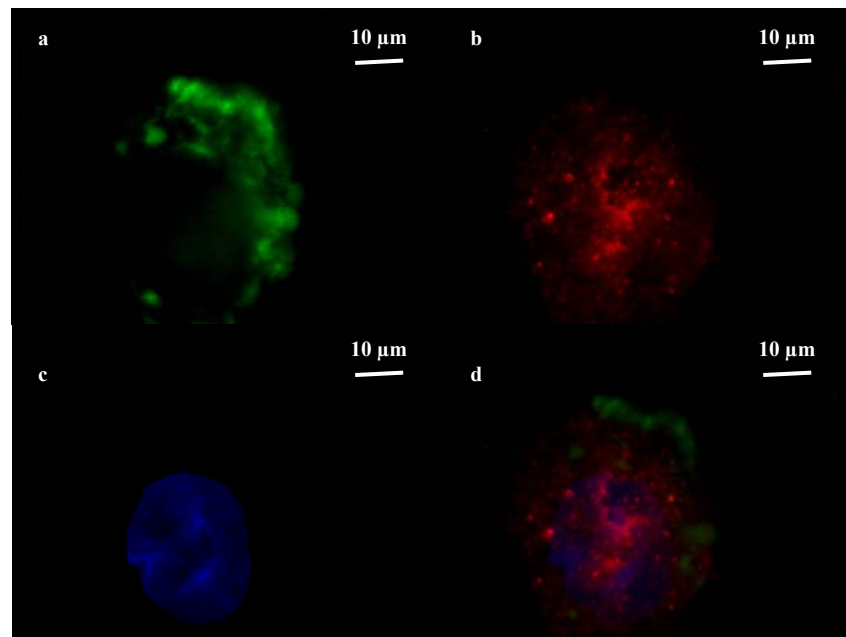
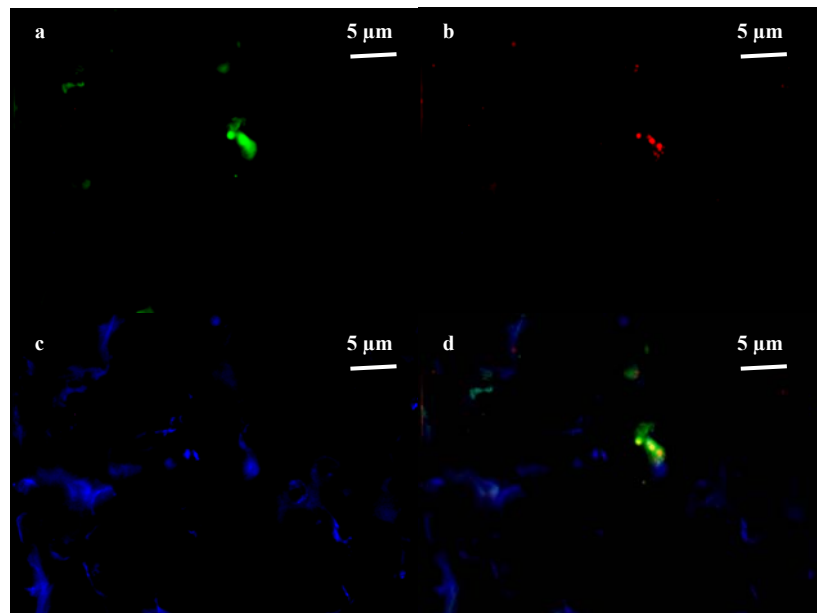


Abbildung 15: **Untersuchungen zur Kolokalisation der Genvektorkomplexe mit Caveolae in verschiedenen Zelllinien.** HeLa (I), BEAS-2B (II), Hep-G2 (III) und EA.hy 926 (IV) Zellen wurden mit auf B-PEI basierenden Genvektorkomplexen, generiert in 5 % Glucose (A) bzw. in HBS (B), transfiziert. Das Polymer wurde mit FITC markiert (a), die Caveolae wurden mit einem rot fluoreszierenden Antikörper detektiert (b) und die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (c). Schließlich wurden die Bilder übereinander gelegt (d).

3.2.3 Untersuchungen zur Kolokalisation der Genvektorkomplexe mit Caveolae *in vivo*

Da sich die zellulären Vorgänge *in vivo* von denen *in vitro* häufig unterscheiden, wurde im nachfolgenden Experiment die Kolokalisation der Genvektorkomplexe mit Caveolae in Mäuselungen (Abb. 16) untersucht. Den Mäusen wurden Genvektorkomplexe basierend auf B-PEI (I), L-PEI (II) und DOTAP (III) in die Schwanzvene injiziert. Im Vergleich zu dem vorangegangenen *in vitro*-Experiment wurde in diesem Versuch zusätzlich das kationische Lipid DOTAP getestet, da sich Lipide *in vivo* teilweise anders Verhalten als Polymere. Die Kolokalisation zwischen Genvektor und DNA ist deutlich zu erkennen. Die Komplexe haben die Mäuselungen also intakt erreicht. Eine Kolokalisation zwischen Genvektorkomplex und Caveolae ist jedoch nicht eindeutig zu erkennen.

I



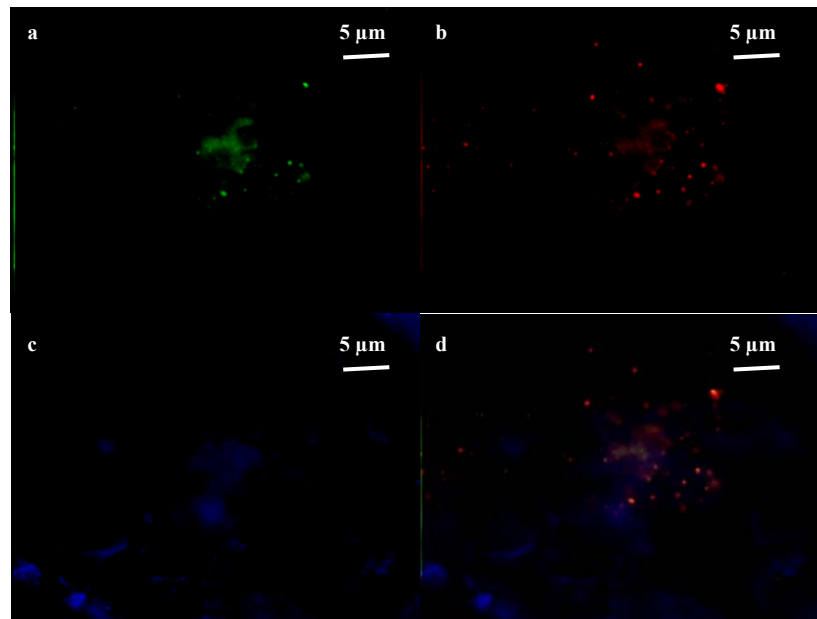
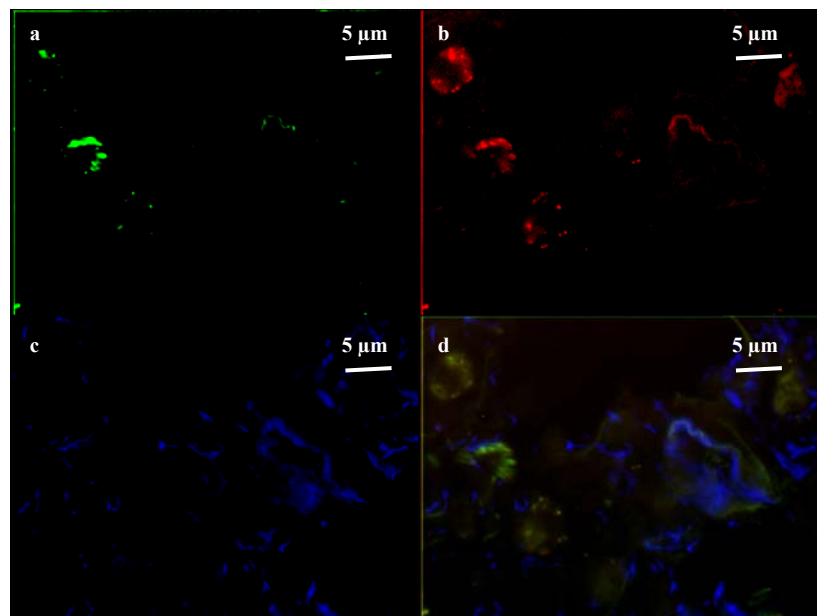
II**III**

Abbildung 16: **Untersuchungen zur Koloalisation der Genvektorkomplexe mit Caveolae in Mäuselungen.** Den Mäusen wurden Genvektorkomplexe basierend auf B-PEI (I), L-PEI (II) und DOTAP (III) in die Schwanzvene injiziert. Die Genvektoren wurden jeweils mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff markiert (a), die DNA wurde mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff markiert (b) und die Caveolae wurden mit einem blau fluoreszierenden Antikörper detektiert (c). Schließlich wurden die Bilder übereinander gelegt (d).

3.3 Der nukleäre Import von DNA unter Verwendung synthetischer Genvektoren in einem zellfreien System

3.3.1 Intaktheit und Funktionalität isolierter Zellkerne

Im letzten Teil der vorliegenden Arbeit geht es um die Frage wie die DNA bei einer Transfektion von Zellen mit synthetischen Genvektorkomplexen in den Zellkern gelangt. Für die erfolgreiche Transkription und Translation ist das Freisetzen der DNA, also eine Dissoziation des Komplexes Voraussetzung (Bieber *et al.*, 2002). Es stellt sich daher insbesondere die Frage, ob diese Dissoziation noch im Zytosol oder erst im Inneren des Zellkerns stattfindet. Um diese Frage zu klären wurde ein Testsystem entwickelt, das isolierte Zellkerne verwendet. Die zur Transkription und Translation benötigten Komponenten werden den isolierten Zellkernen in einem mit verschiedenen Substanzen (siehe 2.9 Studien an isolierten Zellkernen) supplementierten Retikulozytenlysat zur Verfügung gestellt. Dieses System ermöglicht die Analyse der Vorgänge zwischen Genvektorkomplex und Zellkern ohne umgebendes Zytoskelett bzw. endozytotische Vesikel. Die Isolierung der Zellkerne erfolgt mittels Dichtegradientenzentrifugation. Um die Unversehrtheit der Zellkerne nach dem Prozess der Isolierung zu untersuchen wurden diese, angefärbt mit Trypanblau, zunächst rein morphologisch unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Abbildung 17a zeigt, dass die isolierten Zellkerne intakt sind. Die Reinheit der Zellkerne wurde untersucht indem sie mit Brefeldin A Bodipy® 558/568 Konjugat, das das ER selektiv anfärbt, inkubiert wurden. Abbildung 17c zeigt, dass die Zellkerne frei von ER sind. Zum Vergleich wurden lysierte Zellen mit Brefeldin A Bodipy® 558/568 Konjugat inkubiert (Abb. 17b). Hier ist das ER deutlich zu erkennen.

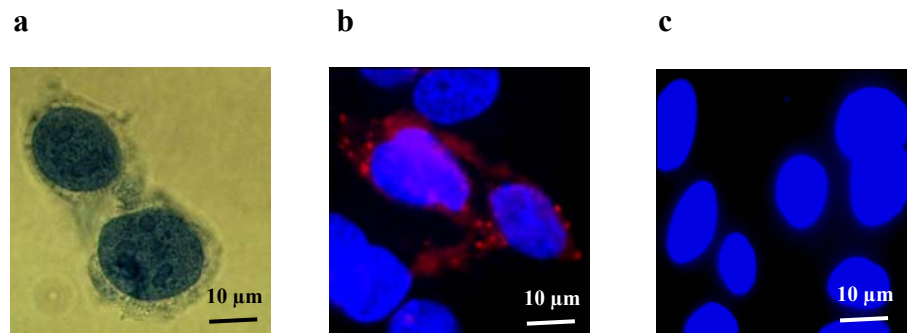


Abbildung 17: **Morphologische Betrachtungen zur Intaktheit der isolierten Zellkerne.** (a) Lichtmikroskopische Aufnahme von Zellkernen, die mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen wurden. Die Zellkerne wurden zur morphologischen Überprüfung der Intaktheit mit Trypanblau angefärbt. (b und c) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Zellkernen in lysierten Zellen (b) und Zellkernen nach Dichtegradientenzentrifugation (c). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blaues Fluoreszenzsignal) sichtbar gemacht. Brefeldin A Bodipy® 558/568 Konjugat wurde eingesetzt um das ER anzufärben (rotes Fluoreszenzsignal).

Die Intaktheit der Zellkerne wurde zusätzlich durch die Inkubation mit FITC-BSA kontrolliert. Aufgrund seines hohen Molekulargewichts von 68 kDa ist es BSA nicht möglich durch die Zellkernporen in die intakten Zellkerne zu gelangen. Abbildung 18 zeigt mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie erstellte Aufnahmen. Sie zeigen einen Schnitt durch die Mitte einiger ausgewählter Zellkerne. FITC-BSA akkumuliert an den Zellkernmembranen, ist jedoch nicht innerhalb der Zellkerne zu detektieren (Abb. 18c). Dies spricht für die Intaktheit der isolierten Zellkerne. Wären sie bei der Zentrifugation beschädigt worden, würde man FITC-BSA auch innerhalb der Zellkerne detektieren.

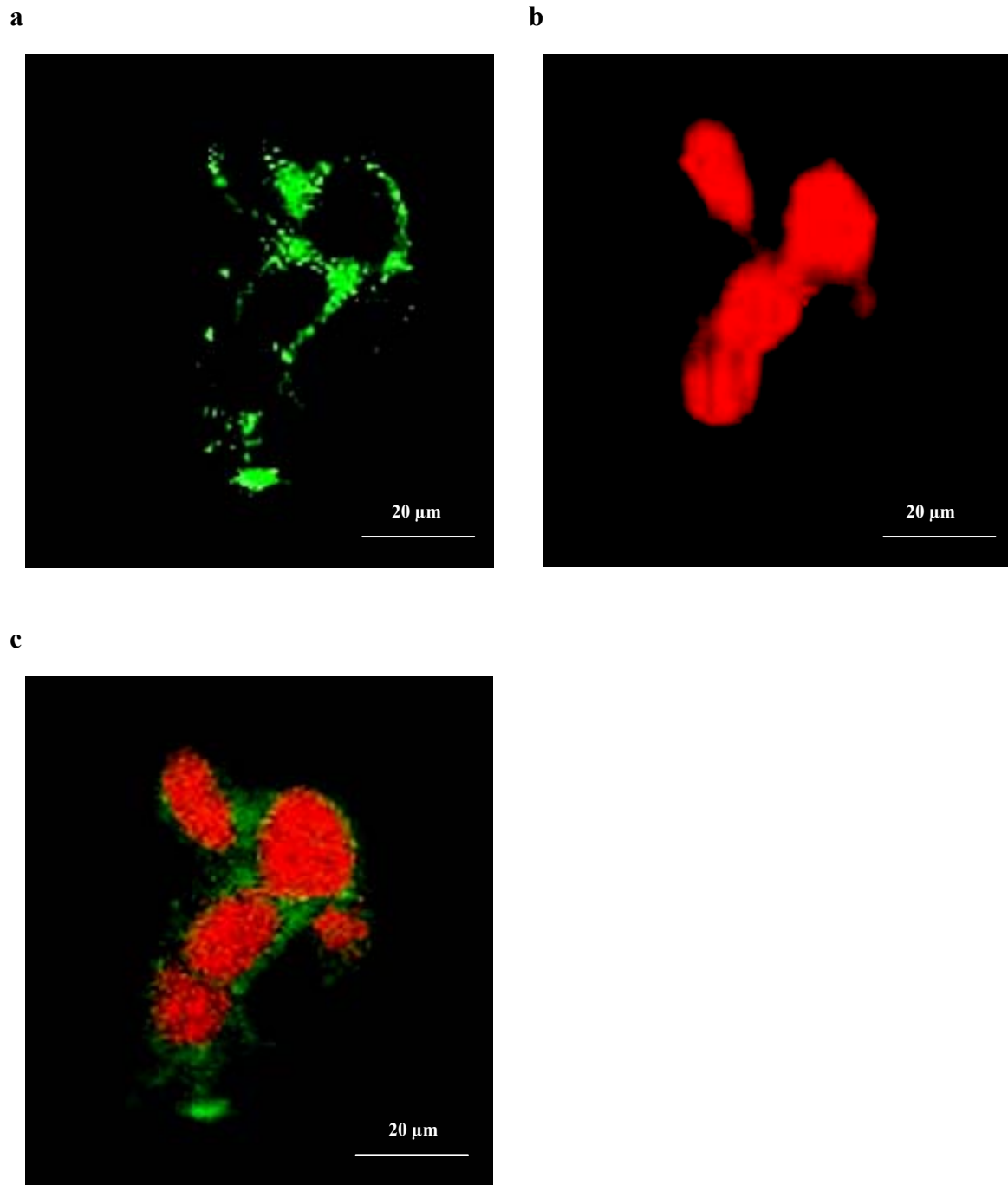


Abbildung 18: **Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie zur Untersuchung der Intaktheit isolierter Zellkerne.** Die mittels Dichtegradientenzentrifugation isolierten Zellkerne wurden mit FITC-BSA inkubiert (a), die Zellkerne wurden mit PI angefärbt (b). Überlagerung von a und b (c).

Um die Funktionsfähigkeit der isolierten Zellkerne zu testen, d.h. ihre Fähigkeit zur Transkription, wurden diese mit Genvektorkomplexen inkubiert. Als Plasmid DNA wurde pEGFP-N1 verwendet. Das grüne Fluoreszenzsignal in Abbildung 19.IIb wird vom EGFP

Protein emittiert und zeigt, dass der Zellkern funktionsfähig ist. Der Zellkern wurde mit PI gegengefärbt (Abb. 19.IIa). In Abbildung 19.IIc wurden die Abbildungen a und b übereinander gelegt. Hier sieht man, dass das EGFP Protein diffundiert und sich ein Teil außerhalb des Zellkerns befindet. Indem man die notwendigen zellulären Komponenten für die Proteinsynthese wie sie im zugesetzten ZL vorkommen, nämlich tRNA, Ribosomen und Aminosäuren zur Verfügung stellt, sind die isolierten Zellkerne in der Lage das EGFP Protein zu produzieren. Aufgrund der Ungeschütztheit der Plasmid DNA konnte nur ein geringer Prozentsatz an Zellkernen beobachtet werden der EGFP exprimierte. Zum Vergleich sieht man in Abbildung 19.Ib, dass eine EGFP Produktion nicht möglich ist, wenn die Genvektorkomplexe mit den Zellkernen in 5 % Glucose, an Stelle von ZL, inkubiert werden.

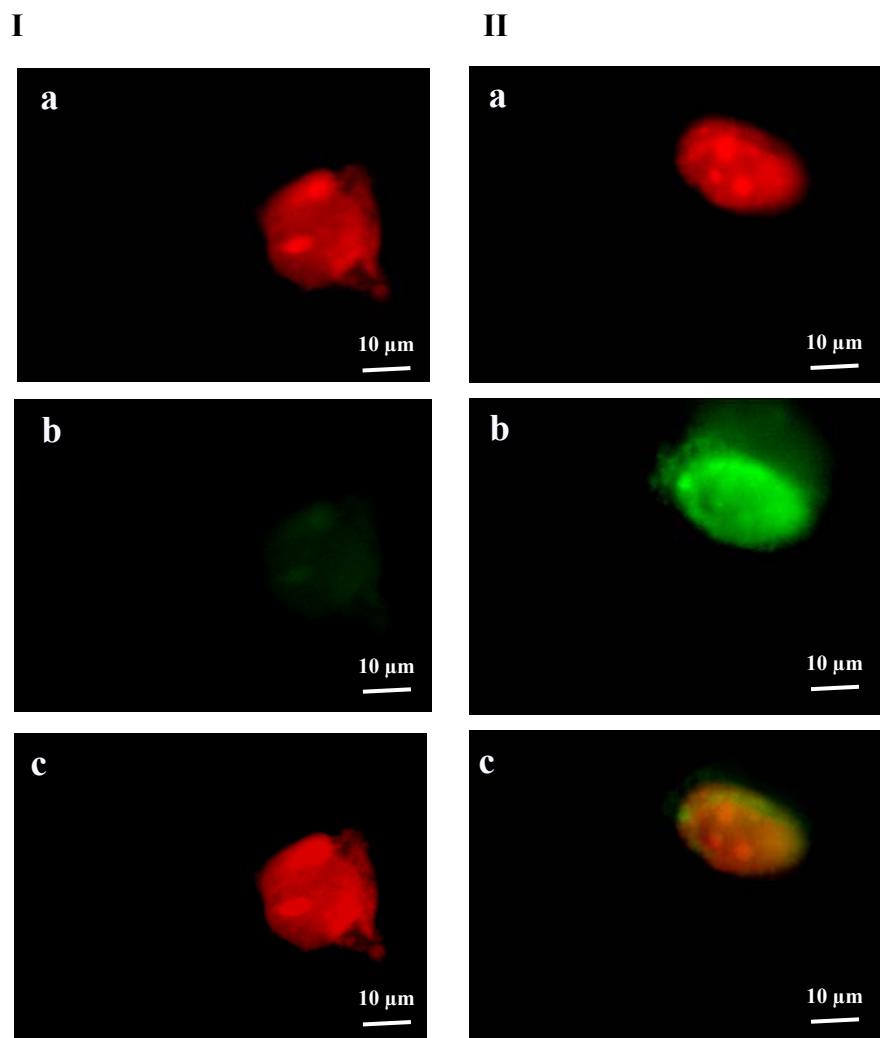


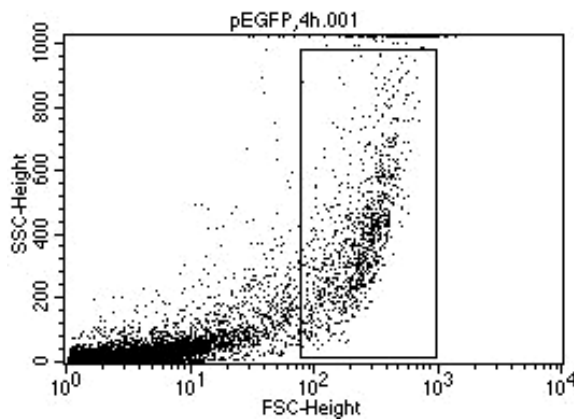
Abbildung 19: **Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Funktionalität der isolierten Zellkerne.** Isolierte Zellkerne wurden mit dem Plasmid pEGFP-N1 wie unter 2.9 „Studien an isolierten Zellkernen“ beschrieben in 5 % Glucose (I) bzw. in ZL (II) inkubiert. (a) Zellkerne,

die mit PI gegengefärbt wurden, (b) Kanal für die Detektion von EGFP, (c) Überlagerungen von a und b.

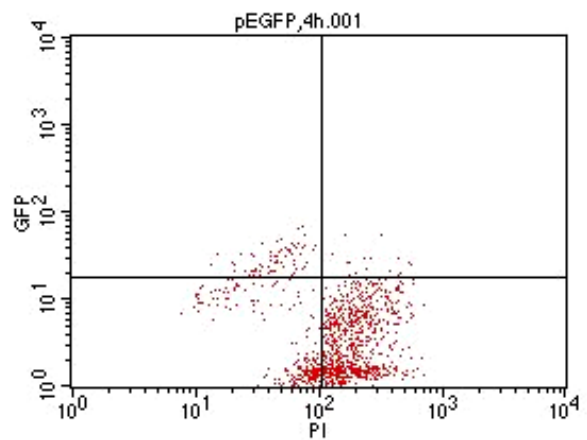
3.3.2 Erzielte Gentransfereffizienzen im zellfreien System

Um die Gentransfereffizienz, die an isolierten Zellkernen erzielt wird zu quantifizieren, wurden die Zellkerne mittels Durchflußzytometrie analysiert. Hierzu müssen zunächst die Zellkerne als zu untersuchende Objekte eingegrenzt werden. Dies erfolgte durch ihre FSC- und SSC-Charakteristika. In den Abbildungen 20.Ia, 20.IIa, 20.IIIa und 20.IVa sind die eingegrenzten Zellkerne zu sehen. Die EGFP produzierenden Zellkerne sind schließlich im oberen rechten Quadranten der Abbildungen 20.Ib, 20.IIb, 20.IIIb und 20.IVb zu sehen. Dabei handelt es sich um die Zellkerne, die sowohl von PI angefärbt wurden, als auch grün fluoreszieren. Dargestellt ist hier ein repräsentatives Experiment. Die Zellkerne wurden mit „nackter“ Plasmid DNA und Genvektorkomplexen basierend auf B-PEI, L-PEI und PLL transfiziert.

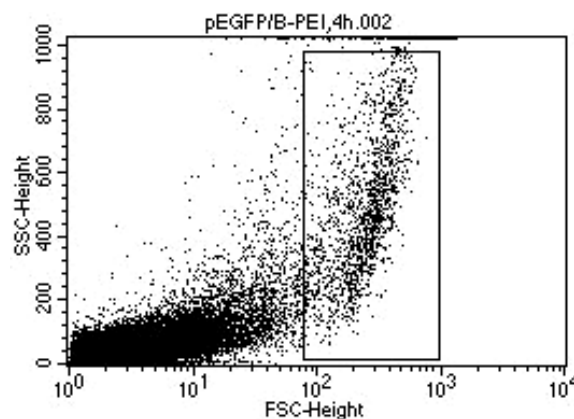
I.a



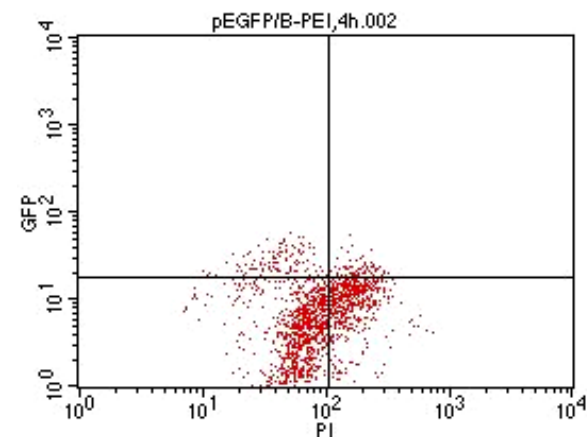
I.b



II.a



II.b



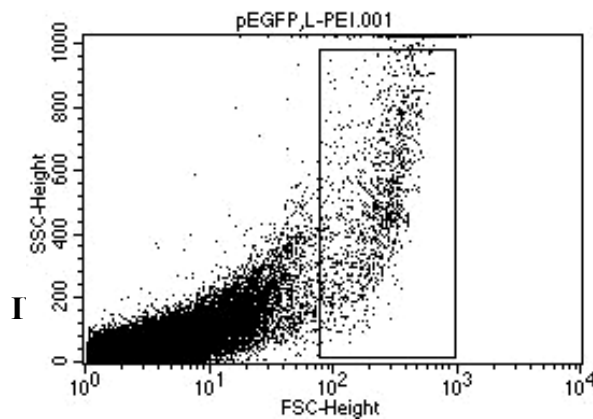
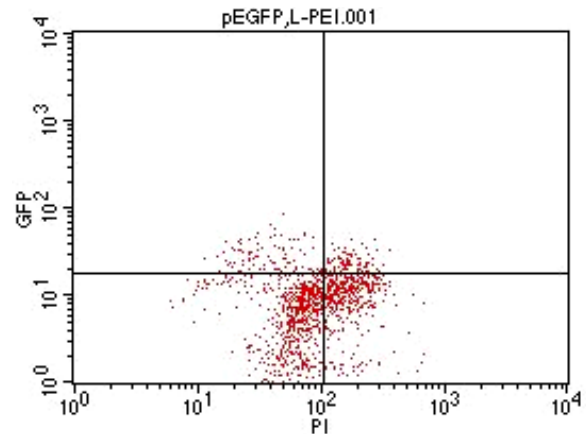
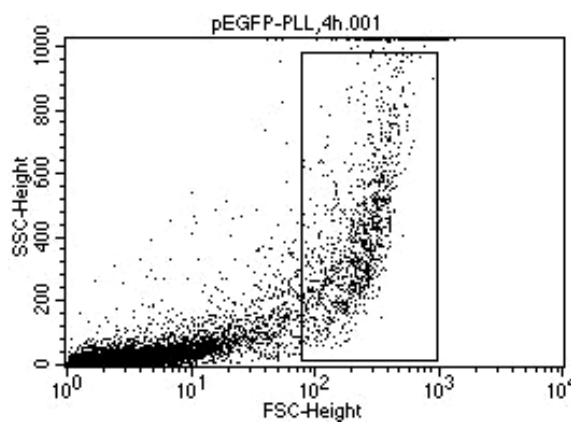
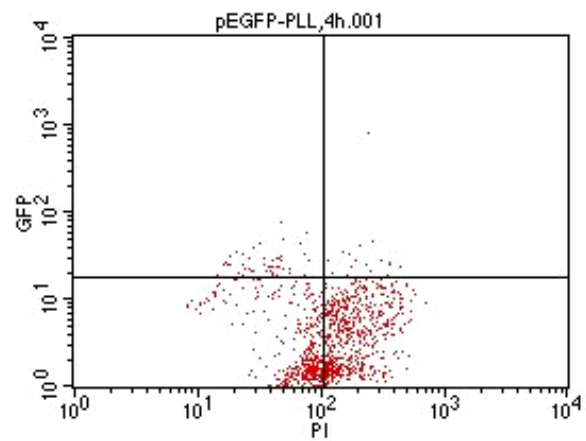
III.a**III.b****IV.a****IV.b**

Abbildung 20: **Durchflußzytometrische Analyse der erzielten Gentransfereffizienzen verschiedener synthetischer Genvektoren unter Verwendung von isolierten Zellkernen.**

Die eingegrenzten Bereiche der Abbildungen I.a, II.a, III.a und IV.a zeigen die Zellkerne. Diese wurden anhand von FSC (Abszisse) und SSC (Ordinate) charakterisiert. In den Abbildungen I.b, II.b, III.b und IV.b sind im oberen rechten Quadranten die Zellkerne dargestellt, die EGFP exprimieren. (I) nackte Plasmid DNA. Genvektorkomplexe basierend auf (II) B-PEI, (III) L-PEI und (IV) PLL (Abszisse: PI gefärbte Zellkerne; Ordinate: EGFP-exprimierende Zellkerne).

Die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments sind dargestellt.

In Abbildung 21 sind die Gentransfereffizienzen als Rate EGFP-positiver Zellkerne aus den Mittelwerten dreier unabhängiger Experimente dargestellt. Die Verwendung „nackter“ DNA zeigt die niedrigste Gentransfereffizienz. Die Genvektorkomplexe basierend auf PEI zeigen

eine signifikant erhöhte Gentransfereffizienz verglichen mit den auf PLL basierenden Genvektorkomplexen, und eine signifikante Erhöhung der Gentransfereffizienz verglichen mit „nackter“ DNA. Der auf L-PEI basierende Genvektorkomplex zeigt die höchste Gentransfereffizienz.

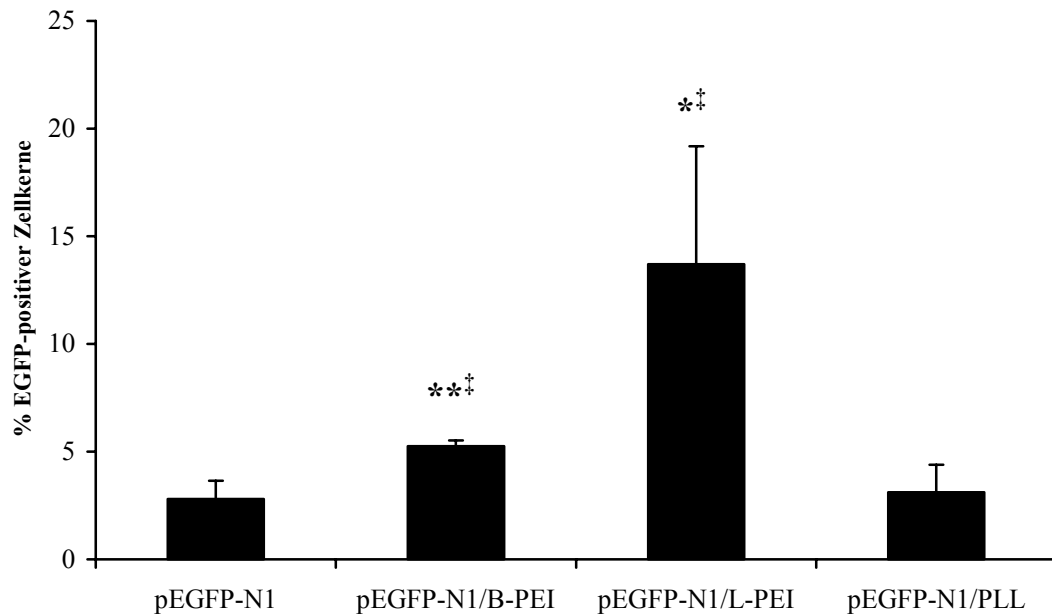


Abbildung 21: Durchflußzytometrische Quantifizierung der erzielten Gentransfereffizienzen von auf B-PEI, L-PEI und PLL basierenden Genvektorkomplexen unter Verwendung von isolierten Zellkernen.

Die Zellkerne wurden mit pEGFP-N1 bzw. mit Komplexen aus pEGFP-N1 und B-PEI, L-PEI sowie PLL inkubiert.

* Werte, die sich signifikant von pEGFP-N1 unterscheiden (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$; $n = 1$).

† Werte, die sich signifikant von pEGFP-N1/PLL unterscheiden ($p \leq 0,05$).

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten angegeben.

Zur Expression von EGFP ist es zunächst notwendig, dass die Plasmid DNA pEGFP-N1 in den Zellkernen transkribiert wird. Die so entstehende mRNA gelangt in das die Zellkerne umgebende ZL, wo sie an Ribosomen bindet. Dort finden die Translation und schließlich die Proteinbiosynthese statt. Wie in Abbildung 17 bereits gezeigt wurde, sind die Zellkerne frei von ER. Translation und Proteinbiosynthese finden daher ausschließlich an den im ZL

enthaltenen Ribosomen statt, und nicht an den Ribosomen des rauen ER. Bezüglich der Quantifizierung der Gentransfereffizienz mittels Durchflußzytometrie stellte sich nun die Frage, ob die mRNA für das produzierte Protein EGFP von den Zellkernen stammt, in die EGFP durch Diffusion gelangt ist. Diese Zellkerne werden als grün fluoreszierend durch die Methode der Durchflußzytometrie erkannt. Eine andere Möglichkeit wäre, dass EGFP durch Diffusion auch in andere, weiter entfernte, Zellkerne gelangt sein könnte. Um diese Frage zu klären wurde der Überstand eines bereits für 4 h in ZL inkubierten Ansatzes von Zellkernen und L-PEI/DNA-Komplexen zu neuen Zellkernen gegeben. Abbildung 22 zeigt den Prozentsatz EGFP produzierender Zellkerne nach 4 h (Balken 1) und nach einer weiteren Inkubation des Überstandes mit neuen Zellkernen für 4 h (Balken 2). Die Anzahl grün fluoreszierender Zellkerne nach Inkubation des Überstandes mit neuen Zellkernen liegt bei nur 1 %, und ist damit signifikant geringer als nach Inkubation der Zellkerne mit L-PEI/DNA-Komplexen. Daher lässt sich aussagen, dass die gemessene grüne Fluoreszenz von der EGFP-Expression der Ribosomen stammt, die sich in unmittelbarer Nähe zu den positiven Zellkernen befinden. Die Diffusion von EGFP im ZL ist offensichtlich zu gering, als dass es größere Strecken zurücklegen könnte.

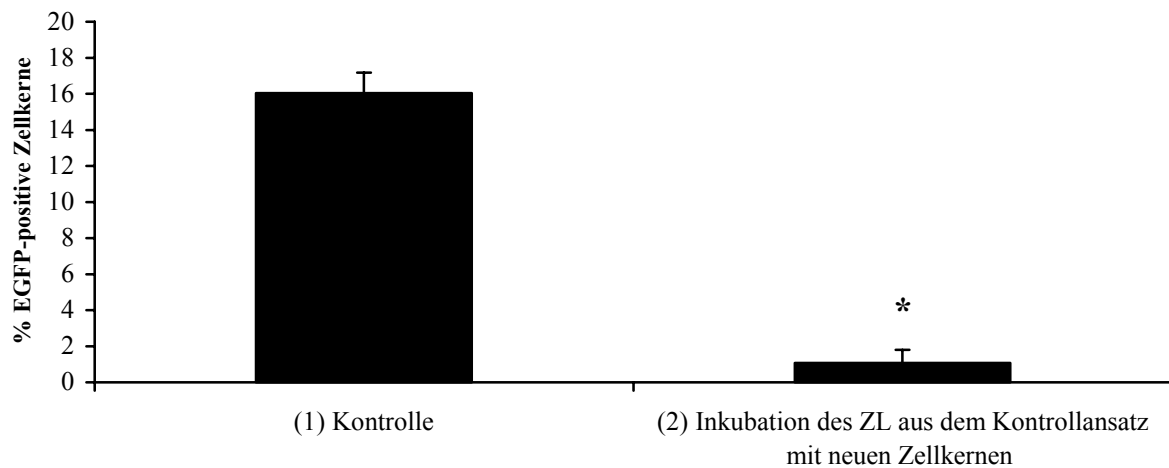


Abbildung 22: **Durchflußzytometrische Untersuchungen zur Diffusion von EGFP innerhalb des Ansatzes.** pEGFP-N1 wurde mit L-PEI komplexiert. Nach der Inkubation wie unter 2.9 „Studien an isolierten Zellkernen“ beschrieben, wurde der Überstand zu einem neuen Ansatz mit 1×10^6 isolierten Zellkernen gegeben und für weitere 4 h bei 37°C inkubiert. Die Zellkerne beider Ansätze wurden mittels Durchflußzytometrie analysiert.

* Werte, die sich signifikant von der Kontrolle unterscheiden (* $p \leq 0,01$; $n = 1$). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten angegeben.

3.3.3 Die Notwendigkeit der SV40-Sequenz für die Effizienz der Aufnahme von Plasmid DNA unter Verwendung isolierter Zellkerne

Der nukleäre Import von Plasmid DNA in sich nicht teilende Zellen ist essentiell für den Lebenszyklus zahlreicher Viren und den effizienten Gentransfer. Dean und Kollegen konnten zeigen, dass der nukleäre Import von Plasmid DNA sequenzabhängig ist (Dean *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 1999). Sie identifizierten eine Region der SV40 (Simian Virus 40) DNA, die den „ori of replication“ und die frühen und späten Promotoren enthält, als eine den Import von Plasmid DNA unterstützende Sequenz. Diese SV40-Sequenz transportiert Plasmid DNA durch Bindung an verschiedene Transkriptionsfaktoren durch die Zellkernporen in den Zellkern. Im nachfolgenden Experiment wurde getestet, ob diese Sequenz auch die Gentransfereffizienz im hier verwendeten zellfreien System steigert. Hierzu wurden die Plasmide pEGFP-N1 bzw. pEGFP-N1 Δ SV40, in dem die SV40-Sequenz deletiert ist, mit L-PEI komplexiert. Abbildung 23 zeigt das Ergebnis des Gentransfers quantifiziert mittels Durchflußzytometrie. In Abwesenheit der SV40-Sequenz lässt sich eine signifikante Abnahme der Gentransfereffizienz beobachten. Dies legt den Schluss nahe, dass die Plasmid DNA als solches in den Zellkern gelangt und PEI dafür nicht benötigt wird. Andernfalls wäre kein Unterschied zwischen den beiden Ansätzen zu sehen. Diese Ergebnisse sprechen für eine Dissoziation der Komplexe bevor die DNA in den Zellkern gelangt.

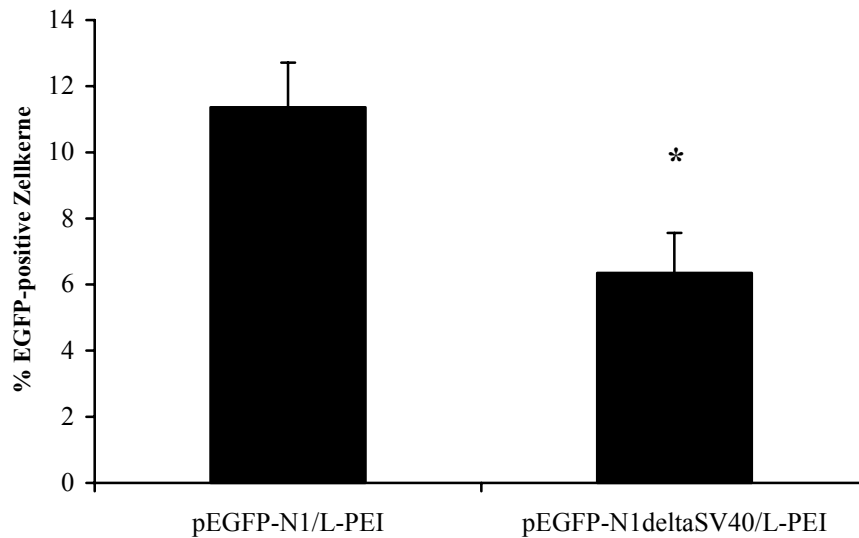


Abbildung 23: **Durchflußzytometrische Untersuchungen zur Notwendigkeit der SV40-Sequenz für die Effizienz der Aufnahme von Plasmid DNA.** Die Plasmide pEGFP-N1 bzw. pEGFP-N1 Δ SV40 wurden mit L-PEI komplexiert.

* Werte, die sich signifikant von pEGFP-N1/L-PEI unterscheiden (* $p \leq 0,01$; $n = 1$). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten angegeben.

3.3.4 Lokalisierung von PEI und DNA unter Verwendung des zellfreien Systems

Das Ergebnis aus dem vorangegangenen Versuch gibt den Hinweis auf eine Dissoziation der Komplexe noch bevor die DNA in den Zellkern gelangt. Im folgenden Versuch sollte diese potentielle Dissoziation daher mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie genauer untersucht werden. In Abbildung 24 ist die Lokalisierung von Fluoreszenz-markiertem PEI und Fluoreszenz-markierter DNA dargestellt. Gezeigt ist ein Schnitt durch die Mitte einiger repräsentativer Zellkerne, die mit Genvektorkomplexen basierend auf B-PEI und L-PEI inkubiert wurden. Als Gegenfärbung für die Zellkerne wurde PI verwendet. Abbildung 24a zeigt Zellkerne, die mit FITC-B-PEI/DNA-Komplexen inkubiert wurden. Man kann hier sehen, dass das Polymer größtenteils an der Zellkernmembran akkumuliert. Zellkerne, die mit Fluorescein-markierten L-PEI/DNA-Komplexen inkubiert wurden sind in Abbildung 24b zu sehen. L-PEI lässt sich teilweise in den Zellkernen detektieren. Abbildung 24c ist das Gegenstück zu Abbildung 24a. Hier ist die DNA des B-PEI/DNA -Genvektorkomplexes mit Fluorescein markiert. Es ist nur wenig DNA innerhalb des Zellkernes zu erkennen. Es lassen

sich jedoch einige größere Partikel beobachten. Ebenso verhält es sich mit Abbildung 24d, die das Gegenstück zu 24b darstellt.

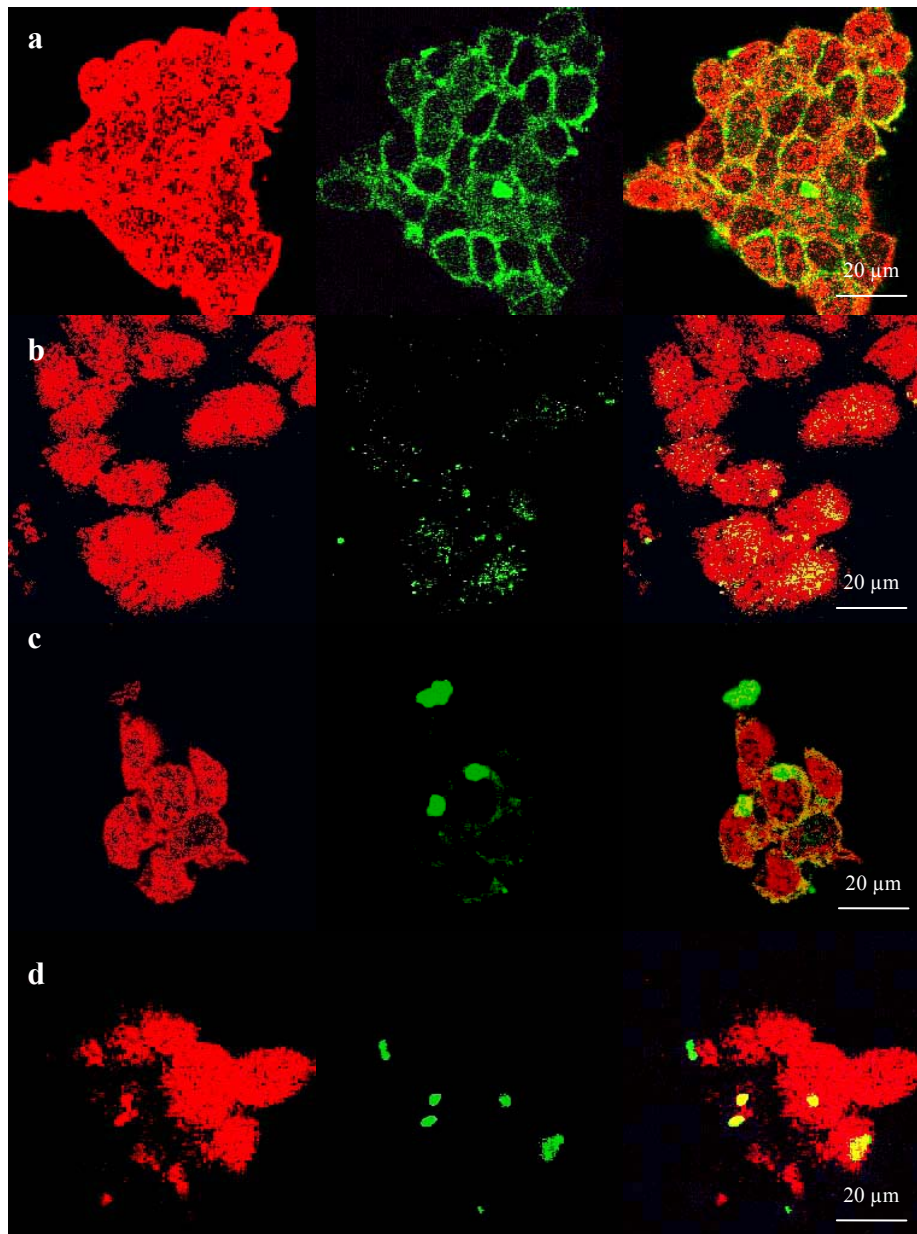
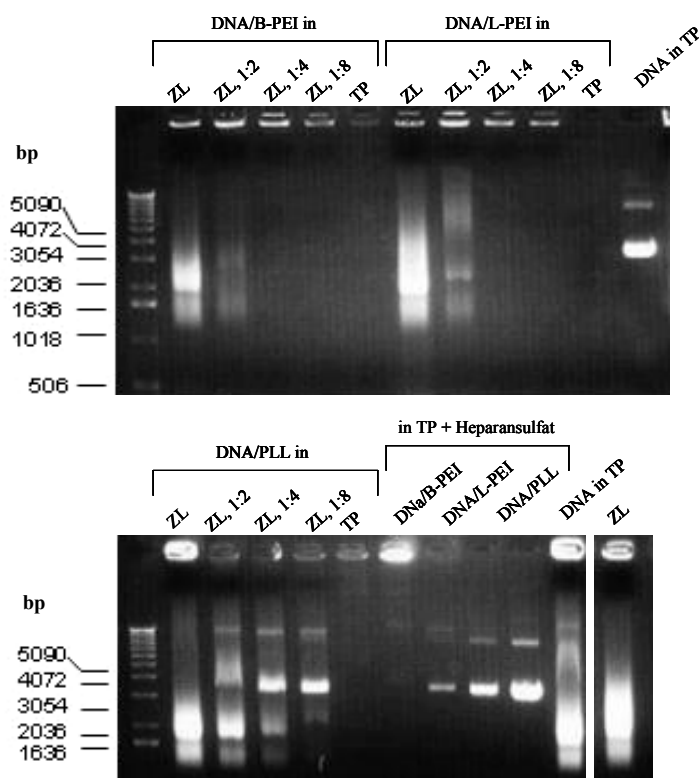


Abbildung 24: **Lokalisierung von PEI und DNA nach Inkubation mit isolierten Zellkernen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie.** Die Zellkerne wurden mit Genvektorkomplexen bestehend aus pCMVLuc und B-PEI (a und c) bzw. L-PEI (b und d) in ZL inkubiert. Die Zellkerne wurden mit PI angefärbt (rotes Fluoreszenzsignal). Die grünen Fluoreszenzsignale werden von FITC-B-PEI (a), Jet-PEI-FluoF™ (b) und Fluoresceinmarkierter DNA (c und d) emittiert.

3.3.5 Einfluss der im Zelllysatz enthaltenen Komponenten auf die Dissoziation der Genvektorkomplexe

Die Daten der beiden vorangegangenen Versuche (Abb. 23 und 24) legen nahe, dass die Genvektorkomplexe im Zytoplasma dissoziieren. In den nachfolgenden Experimenten soll daher der Einfluss der im ZL enthaltenen Komponenten auf diese Dissoziation untersucht werden. Den Einfluss des ZL auf die Stabilität der Genvektorkomplexe zeigt Abbildung 25. Da auch reines ZL im mit Ethidiumbromid behandelten Gel ein Signal zeigt (Abb. 25a, letzte Spur), wahrscheinlich aufgrund im Retikulozytenlysat enthaltener RNA bzw. DNA, wurde ein Southern Blot des Gels angefertigt (Abb. 25b). Dabei wurde eine mit DIG-markierte Sonde gegen das Plasmid pEGFPLuc, das mit den Genvektoren B-PEI, L-PEI und PLL komplexiert wurde, eingesetzt. Durch die Zugabe von Heparansulfat zu den Genvektorkomplexen in TP konnte gezeigt werden, dass es prinzipiell möglich ist die DNA aus den Komplexen heraus zu lösen. Heparansulfat ist ein negativ geladenes Biopolymer, und verdrängt als solches bei einem Überschuss die DNA kompetitiv aus der Bindung mit PEI. Die Inkubation der Genvektorkomplexe in ZL und Verdünnungen des ZL führte ebenfalls zu einer Dissoziation der Komplexe. Dieser Effekt steigt mit zunehmender Konzentration des ZL an. Die Freisetzung der DNA aus DNA/PLL-Komplexen erfolgte bei niedrigerer ZL-Konzentration als bei den auf PEI basierenden Komplexen (Verdünnung 1:2 und unverdünntes ZL).

a



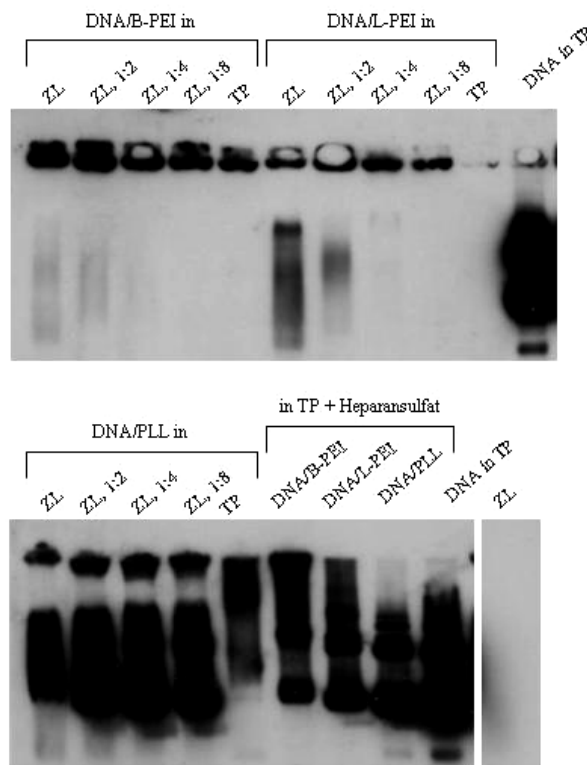
b

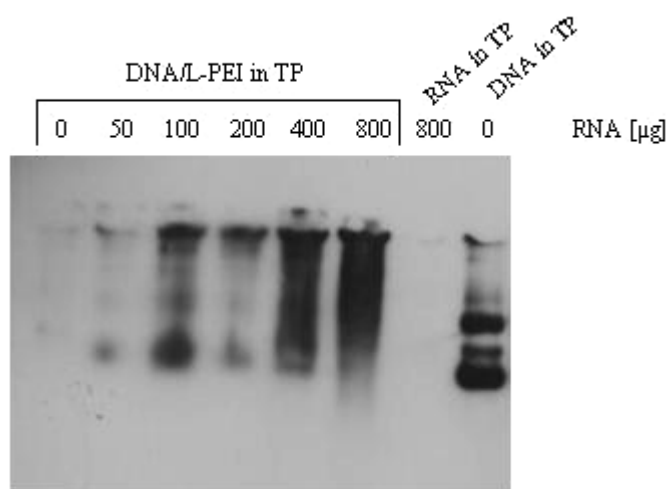
Abbildung 25: **Einfluss des Zelllysats auf die Genvektorkomplexe.** pEGFP_{Luc} wurde mit B-PEI, L-PEI und PLL komplexiert. Die Genvektorkomplexe wurden in ZL, in Verdünnungen von ZL in TP der Verdünnungsstufen 1:2, 1:4 und 1:8 und in TP inkubiert. Um zu zeigen, dass es prinzipiell möglich ist die DNA aus den Komplexen heraus zu lösen, wurde Heparansulfat zu den Komplexen gegeben. Jeweils 0,1 µg DNA der Ansätze wurden in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt. Die DNA wurde im Gel mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht (a). Anschließend wurde ein Southern Blot von dem Gel angefertigt und das Plasmid pEGFP_{Luc} mit einer Sonde detektiert (b).

3.3.6 Die Rolle der zytosolischen RNA für die Dissoziation der Genvektorkomplexe

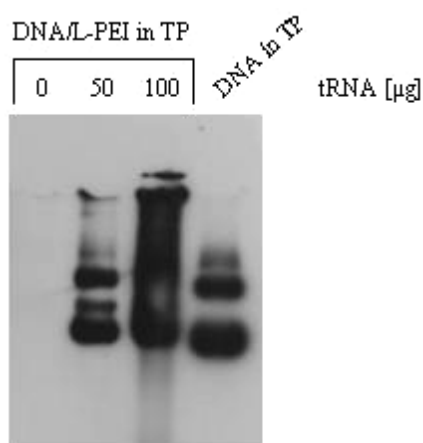
Die Ergebnisse aus dem vorangegangenen Versuch zeigen, dass das ZL in der Lage ist Polyplexe in seine Bestandteile zu dissoziieren. Es stellte sich daher die Frage, welche Komponente des Zytoplasmas hierfür verantwortlich sein könnte. Aufgrund der Ähnlichkeit zu Struktur und Ladung der DNA, sowie des Vorkommens im Zytoplasma wurde RNA auf seine potentielle Fähigkeit zur Dissoziation der Polyplexe getestet. Für die folgenden Experimente wurden als repräsentatives Beispiel nur noch Genvektorkomplexe, die auf L-PEI

basieren verwendet. Inkubiert man diese Genvektorkomplexe in TP und gibt RNA hinzu, so kann man eine zunehmende Freisetzung von DNA aus den Komplexen beobachten, die mit steigender RNA-Konzentration korreliert (Abb. 26a). Derselbe Effekt konnte durch Zugabe von tRNA gezeigt werden. Hier reichen schon geringere Konzentrationen (weniger als 50 μg), um die DNA aus den Komplexen heraus zu lösen (Abb. 26b). Keine Dissoziation der Komplexe konnte beobachtet werden, wenn das ZL zuvor mit RNase A behandelt wurde (Abb. 26c). Diese Ergebnisse zeigen, dass RNA DNA kompetitiv aus der Bindung mit PEI verdrängen kann.

a



b



c



Abbildung 26: **Southern Blot Analyse: Die Rolle von RNA für die Dissoziation der Genvektorkomplexe.** pEGFPLuc wurde mit L-PEI komplexiert und in TP unter Zugabe von 50 μg , 100 μg , 200 μg , 400 μg und 800 μg RNA inkubiert (a). (b) Zugabe von 50 μg und 100

μg tRNA. (c) Die Genvektorkomplexe wurden in ZL inkubiert, das zuvor mit RNase A (1 mg/ml; 0,5 h bei 37°C) behandelt wurde.

Um zu untersuchen, ob derselbe Effekt auch durch DNA, die sich im Retikulozytenlysat befindet (1 μg pro Ansatz; Flexigene DNA Kit/Quiagen; Hilden) ausgelöst werden kann, wurden Genvektorkomplexe in TP unter Zugabe von steigenden Konzentrationen an Plasmid DNA inkubiert. Es wurde ein anderes Plasmid als für die Komplexherstellung verwendet, so dass die Sonde nicht daran binden kann. Eine Freisetzung von DNA konnte beobachtet werden in Anwesenheit von mindestens 8 μg DNA, das entspricht einem 8-fachen Überschuss (Abb. 27).

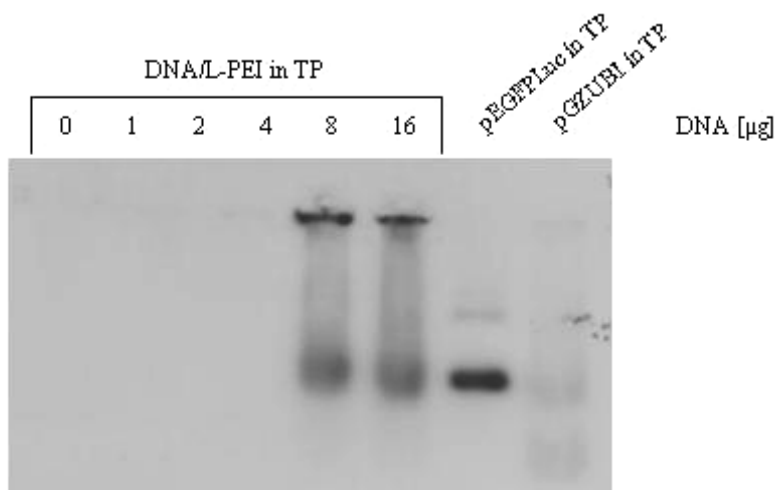


Abbildung 27: **Southern Blot Analyse: Einfluss von zugegebener Plasmid DNA auf die Dissoziation der Genvektorkomplexe.** pEGFP-Luc wurde mit L-PEI komplexiert und in TP unter Zugabe von 1 μg , 2 μg , 4 μg , 8 μg und 16 μg pGZUBI inkubiert.

Abbildung 28 zeigt den Einfluss einer RNase A-Vorbehandlung eines Ansatzes von Zellkernen und L-PEI/DNA-Komplexen in ZL mit anschließender Inkubation dieser Zellkerne in frischem unbehandeltem ZL auf die Gentransfereffizienz. Der erste Balken zeigt den Prozentsatz der EGFP exprimierenden Zellkerne nach einer 4 h Inkubation isolierter Zellkerne mit L-PEI/DNA-Komplexen in unbehandeltem ZL als Kontrolle. Den Prozentsatz EGFP exprimierender Zellkerne nach der Behandlung des ganzen Ansatzes mit RNase A für 4 h, gefolgt von einer weiteren Inkubation dieser Zellkerne in unbehandeltem ZL für 4 h zeigt der zweite Balken. Die Anzahl EGFP exprimierender Zellkerne in Ansatz 2 ist nahezu Null, und daher signifikant niedriger als die Kontrolle. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass RNA für

den Gentransfer essentiell ist. Durch den Zusatz von RNase A konnten die L-PEI/DNA-Komplexe nicht dissoziieren. Andernfalls hätte die DNA in die Zellkerne gelangen können und mRNA hätte während der Inkubation mit neuem ZL aus den Zellkernen in das ZL transportiert werden können, um dort translatiert zu werden. Nur in der Anwesenheit von RNA lässt sich EGFP-Expression beobachten. In Zusammenhang mit den Stabilitätsuntersuchungen der Polyplexe in Anwesenheit von RNA, lässt sich vermuten, dass die DNA durch zytoplasmatische RNA kompetitiv aus der Bindung mit PEI verdrängt wird, und unkomplexiert in den Zellkern gelangt. Auf der anderen Seite belegen diese Ergebnisse, dass die Dissoziation von DNA und PEI eine notwendige Voraussetzung für den erfolgreichen Gentransfer ist. Dabei kommt der RNA eine Schlüsselrolle zu. Die Ergebnisse belegen weiter, dass RNA der essentielle zytoplasmatische Bestandteil ist, der Polyplexe dissoziiert.

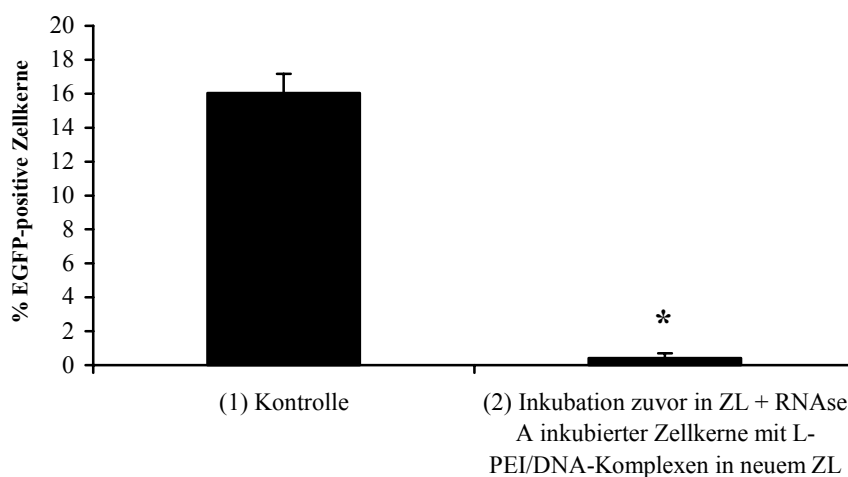


Abbildung 28: **Durchflußzytometrische Analyse bezüglich des Einflusses der Zugabe von RNase A auf die Gentransfereffizienz.** pEGFP-N1 wurde mit L-PEI komplexiert und unter Zugabe von RNase A (1mg/ml) inkubiert. Nach der Inkubation von 4 h wurden die Zellkerne gewaschen, und nach Zugabe von frischem ZL ohne RNase A für weitere 4 h inkubiert (Balken 2). (Balken 1) Kontrollansatz ohne RNase A.

* Werte, die sich signifikant von pEGFP-N1/L-PEI unterscheiden (* $p \leq 0,01$; $n = 1$). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten angegeben.

3.3.7 Vergleich der mit verschiedenen synthetischen Genvektorkomplexen erzielten

Gentransfereffizienzen *in vitro* mit der Stabilität dieser Genvektorkomplexe

Die Southern Blot Analyse (Abb. 25) ergab, dass sich die auf B-PEI, L-PEI bzw. PLL basierenden Genvektorkomplexe untereinander in ihrer Stabilität unterscheiden. Abbildung 29 zeigt die mit diesen Genvektorkomplexen bei der Transfektion von 16HBE14o⁻ Zellen erzielten Gentransfereffizienzen korrespondierend zu ihrer Luziferaseexpression. Wie erwartet, zeigt die nackte DNA nahezu keinen Gentransfer, da sie kaum in die Zellen aufgenommen wird. Die auf PEI basierenden Genvektorkomplexe zeigen eine gesteigerte Gentransfereffizienz verglichen mit den auf PLL basierenden Genvektorkomplexen, und eine signifikante Erhöhung der Gentransfereffizienz verglichen mit „nackter“ DNA. Der auf L-PEI basierende Genvektorkomplex zeigt die höchste Gentransfereffizienz. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass der L-PEI/DNA-Komplex weniger stabil ist als der B-PEI/DNA-Komplex, d. h. die DNA leichter aus dem L-PEI/DNA-Komplex freigesetzt wird. Der auf PLL basierende Komplex zeigt die geringste Stabilität (schon bei der niedrigsten ZL-Verdünnung löst sich die DNA aus dem Komplex), aber auch die niedrigste Gentransfereffizienz der verwendeten Genvektoren. Die gemessenen Gentransfereffizienzen korrespondieren direkt mit den bei der Inkubation isolierter Zellkerne mit denselben Genvektorkomplexen erzielten Gentransfereffizienzen (Abb. 21).

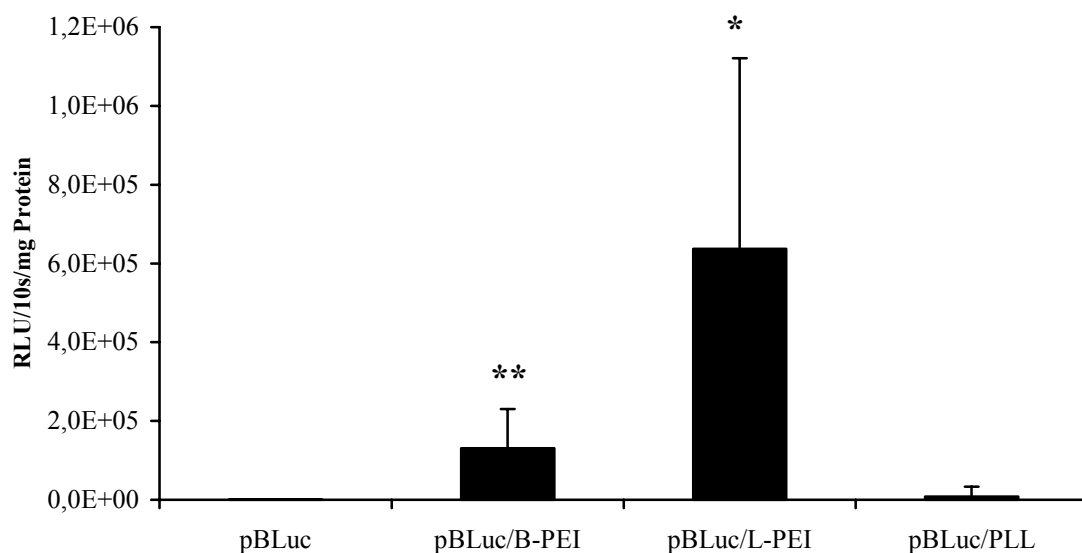


Abbildung 29: **Gentransfereffizienzen von auf B-PEI, L-PEI und PLL basierenden Genvektorkomplexen.** 16HBE14o⁻ Zellen wurden mit pBLuc bzw. mit Komplexen aus pBLuc und B-PEI, L-PEI sowie PLL transfiziert.

* Werte, die sich signifikant von pBLuc unterscheiden (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$; $n = 4$). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten angegeben.

4. Diskussion

4.1 Einblicke in den Mechanismus der zellulären DNA-Aufnahme mittels

Magnetofektion

Die noch relativ neue Transfektionsmethode der Magnetofektion beruht auf der Verwendung superparamagnetischer Eisenoxidnanopartikel als Genvektoren. Der Gentransfer wird durch Anlegen eines Magnetfeldes vermittelt (Scherer *et al.*, 2002). Da diese Methode außergewöhnlich effizient ist, und sich insbesondere durch kurze Inkubationszeiten auszeichnet, sollte hier der, dieser Methode zugrunde liegende, zelluläre Mechanismus der Aufnahme der Genvektorkomplexe aufgeklärt werden. Die Genvektoren selbst bestehen aus superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln, die mit PEI mehrfach beschichtet sind (transMAG^{PEI}). Zunächst stellte sich ganz allgemein die Frage, ob die transMAG^{PEI}/DNA-Komplexe von den Zellen internalisiert werden können. Im Einzelnen sollte der Effekt des Magnetfeldes auf den zellulären Aufnahmeprozess untersucht werden. Es war die Frage zu klären, ob die Aufnahme und der intrazelluläre Transport der transMAG^{PEI}/DNA-Komplexe über Endozytose erfolgt, wie dies bereits für auf PEI basierende Genvektorkomplexe bekannt ist (Bieber *et al.*, 2002; Godbey *et al.*, 1999; Merdan *et al.*, 2002). Alternativ wäre eine direkte Aufnahme der Komplexe durch Permeation der Zellmembran mittels der Kräfte des Magnetfeldes denkbar.

Mittels der Methode der Elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass sowohl die Aufnahme der transMAG^{PEI}-Partikel als auch der transMAG^{PEI}/DNA-Komplexe in HeLa Zellen durch das Umschließen der Partikel bzw. Komplexe durch Ausstülpungen der Zellmembran erfolgt. Die Partikel bzw. Komplexe gelangen durch das Abschnüren der Zellmembran in Form von Vesikeln in das Innere der Zellen. Dort werden sie in intrazytoplasmatischen Vesikeln weiter transportiert bzw. verbleiben in diesen in der Zelle. Der Vorzug der Methode der Magnetofektion besteht scheinbar im schnellen Sedimentieren und Akkumulieren der Genvektorkomplexe an der Zelloberfläche, da eine erhöhte Gentransfereffizienz auch durch Zentrifugation der Genvektorkomplexe auf die Zelloberfläche erreicht werden kann. Dies ist ein wichtiger Aspekt für eine Anwendung *in vivo*, da hier die Zeit des Kontakts mit den Zielzellen eher kurz ist. Die Genvektorkomplexe werden hier beispielsweise durch den Blutstrom weiter transportiert.

Um den endozytotischen Aufnahmemechanismus der transMAG^{PEI}/DNA-Komplexe näher zu untersuchen, wurden Transfektionen in Anwesenheit verschiedener Endozytoseinhibitoren

mit verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Negative Effekte bzw. Verfälschungen der Ergebnisse aufgrund von Toxizität der verwendeten Inhibitoren kann ausgeschlossen werden, da sich in ihrer Anwesenheit weder der Proteingehalt, noch die Vitalität der Zellen verändert hat. Als einzige Ausnahme sinkt die Vitalität der BEAS-2B Zellen in Anwesenheit von Antimycin A signifikant. Dies lässt sich jedoch dadurch erklären, dass Antimycin A den Elektronentransport in der Atmungskette hemmt (zwischen Cytochrom b und c_1) (Simoes *et al.*, 2001), und dadurch den Gehalt an ATP in der Zelle reduziert. Der verwendete Zellproliferationstest jedoch misst die ATP-Konzentration in der Zelle. Die Tatsache, dass Antimycin A diesen Effekt nur auf BEAS-2B Zellen ausübt, spricht für eine zellspezifische Sensitivität auf den Inhibitor.

Antimycin A inhibiert die Endozytose unspezifisch durch Entzug der Energie, d. h. ATP, die für die Endozytose notwendig ist. In Anwesenheit von Antimycin A nimmt die Gentransfereffizienz ab. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass die Aufnahme der transMAG^{PEI}/DNA-Komplexe über Endozytose erfolgt. Von Chloroquin ist bekannt, dass es in den Endozytoseprozess eingreift, indem es den pH Wert in den Vesikeln anhebt (Maxfield, 1982; Poole and Ohkuma, 1981), und zu einem verringerten Abbau der Komplexe durch lysosomale Enzyme führt (Hedin and Thyberg, 1985; Poole *et al.*, 1977; Stenseth and Thyberg, 1989; Strous *et al.*, 1985; Thyberg *et al.*, 1985; Wibo and Poole, 1974). Des Weiteren inhibiert die endosomale Neutralisierung den Transport zu den späten Endosomen (Hedin and Thyberg, 1985; Sonawane *et al.*, 2003; Stenseth and Thyberg, 1989; Strous *et al.*, 1985). Außerdem wird Chloroquin wegen seiner endosomolytischen Wirkung eingesetzt. Chloroquin ist wegen dieser Eigenschaften eine weit verbreitete Substanz um die Gentransfereffizienz von auf PLL basierenden Genvektorkomplexen zu steigern. Im Gegensatz hierzu, nimmt die Gentransfereffizienz unter Verwendung der transMAG^{PEI}/DNA-Komplexe in Anwesenheit von Chloroquin ab. Diese Beobachtungen erscheinen widersprüchlich. Forrest und Pack (Forrest and Pack, 2002) konnten jedoch zeigen, dass auf PEI basierende Genvektorkomplexe in der Anwesenheit von Chloroquin durch den reduzierten Transport zu den späten Endosomen vermehrt in den frühen Endosomen verbleiben. Der Transport zu den späten Endosomen scheint jedoch für einen effizienten Gentransfer ebenso notwendig zu sein, wie die lysosomale Ansäuerung. Diese ist gemäß der „Protonenschwammhypothese“ (Bieber *et al.*, 2002; Boussif *et al.*, 1995; Merdan *et al.*, 2002) die Voraussetzung für die Freisetzung der auf PEI basierenden Genvektorkomplexe aus den Endosomen (Sonawane *et al.*, 2003). Diese Beobachtungen untermauern die Rolle der Endozytose für die Aufnahme der transMAG^{PEI}/DNA-Komplexe. Die Anwesenheit von

Monensin, das als Ionophor die Struktur und Funktion des Golgi Apparates und der Lysosomen zerstört (Dettloux *et al.*, 1991; Tammi *et al.*, 2001) hat keinen Einfluss auf die Gentransfereffizienz. Die zelluläre Aufnahme über Caveolae stellt einen weiteren endozytotischen Prozess dar, der für die Magnetofektion eine Rolle spielen könnte. In Anwesenheit von Progesteron, das den Transport von Cholesterol vom ER zur Plasmamembran blockiert (Smart *et al.*, 1996), nimmt die Gentransfereffizienz der Magnetofektion ab. Nystatin, das die Ausbildung der Caveolae durch seine hohe Affinität zu Cholesterol hemmt (Schnitzer *et al.*, 1994; Tammi *et al.*, 2001), führt zu einer Abnahme der Gentransfereffizienz der Magnetofektion in HeLa Zellen, nicht jedoch in BEAS-2B und Hep-G2 Zellen. Hierbei handelt es sich offensichtlich um einen Zelllinien spezifischen Effekt. PMA, das ebenfalls die Ausbildung der Caveolae hemmt (Smart *et al.*, 1995; Smart *et al.*, 1994), führt zu einer Abnahme der Gentransfereffizienzen. Zusammengefasst lassen diese Daten den Schluss zu, dass Caveolae eine Rolle in der Aufnahme der transMAG^{PEI}/DNA-Komplexe spielen. Interessanterweise konnte keine DNA innerhalb der Caveolae auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen entdeckt werden. Dies könnte an der eingeschränkten Möglichkeit der Caveolae liegen die relativ großen Genvektorkomplexe aufzunehmen. Kleinere Komplexe liegen eventuell unter der Detektionsgrenze.

Der Transport von den frühen zu den späten Endosomen wird über Mikrotubuli vermittelt (Durrbach *et al.*, 1996; Sodeik *et al.*, 1997). Um zu untersuchen, ob Mikrotubuli bei der Magnetofektion involviert sind, wurde der Effekt von auf die Mikrotubuli einwirkenden Substanzen auf die Effizienz der Magnetofektion getestet. Die Zugabe von Colchizin, das in der Lage ist die Mikrotubuli zu depolymerisieren (Durrbach *et al.*, 1996; Sodeik *et al.*, 1997), führt zu einer Abnahme der Gentransfereffizienz in HeLa und Hep-G2 Zellen. Eine Erklärung hierfür ist die Hemmung des endosomalen Transports von transMAG^{PEI}/DNA-Komplexen durch das Fehlen der Mikrotubuli im Zytoplasma. Als antimitotische Substanz führt Colchizin zusätzlich zu einer Störung im Aufbau des Spindelapparates. Dies könnte die Verteilung der DNA im Zellkern während der Mitose stören. Dieser Effekt könnte insofern eine große Rolle spielen, als man annimmt, dass die Transfektionseffizienz nicht-viraler Genvektorsysteme in großem Maße von der Zellteilung abhängt (Brunner *et al.*, 2000). Die Anwesenheit von Nocodazol, das wie Colchizin die Mikrotubuli depolymerisiert, führt ebenfalls zu einer Abnahme der Gentransfereffizienz in HeLa Zellen. Diese Beobachtungen stimmen mit denen von Suh *et al.* (Suh *et al.*, 2003) überein, die zeigen konnten, dass auf PEI basierende Genvektorkomplexe durch so genannte Motorproteine durch das Zytoplasma zum Zellkern transportiert werden. In BEAS-2B Zellen führt die Anwesenheit von Colchizin und

Nocodazol zu einer Veränderung der Gentransfereffizienz in Richtung Anstieg. Die Zugabe von Taxol, das die Mikrotubuli durch Beschleunigung ihrer Polymerisation stabilisiert (Hasegawa *et al.*, 2001), beeinflusst die Gentransfereffizienz nicht. Cytochalasin B ist in der Lage filamentöses Aktin zu depolymerisieren. Aktin ist für die Aufnahme von Stoffen über Endozytose notwendig (Durrbach *et al.*, 1996; Kopatz *et al.*, 2004; Matsui *et al.*, 1997). Die Anwesenheit von Cytochalasin B führt zu einer Abnahme der Gentransfereffizienz. Daraus lässt sich schließen, dass das filamentöse Aktin für die Aufnahme der transMAG^{PEI}/DNA-Komplexe notwendig ist. Da Aktin auch in den zellulären Ausstülpungen vorkommt, die auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu erkennen sind, unterstreichen diese Ergebnisse die Rolle der zytoplasmatischen Ausstülpungen für die Aufnahme der transMAG^{PEI}/DNA-Komplexe.

Um nun Aussagen darüber treffen zu können, ob die zelluläre Aufnahme der transMAG^{PEI}/DNA-Komplexe ebenso wie die von auf PEI basierenden Genvektorkomplexen erfolgt, wurden Transfektionen mit auf PEI basierenden Genvektorkomplexen in Anwesenheit derselben Endozytoseinhibitoren wie zuvor für die Magnetofektionsexperimente durchgeführt. Die Gentransfereffizienzen der Transfektionen von HeLa Zellen verhalten sich analog zu denen der Magnetofektionen. Nur bezüglich der Inhibitoren, die auf die Ausbildung der Caveolae wirken, gibt es Abweichungen in BEAS-2B und Hep-G2 Zellen.

Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass einige Inhibitoren verschiedenen Einfluss auf verschiedene Zelllinien haben. Dies könnte ein Hinweis auf unterschiedliche Aufnahmemechanismen abhängig von der jeweiligen Zelllinie sein. Vergleicht man die Gentransfereffizienzen zwischen Transfektion und Magnetofektion der verschiedenen Zelllinien so findet man nahezu das gleiche Muster. Folglich scheint die Aufnahme der transMAG^{PEI}/DNA-Komplexe ebenso, wie schon für die auf PEI basierenden Genvektorkomplexe bekannt, über Endozytose zu erfolgen.

Um sicher zu gehen, dass beide endosomalen Wege, der über „Clathrin coated pits“ und der über Caveolae, in allen verwendeten Zelllinien existieren, wurden diese Wege über Marker nachgewiesen. Die epifluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen deutlich die Existenz der verschiedenen Vesikel in allen verwendeten Zelllinien.

Als Nächstes sollte der Einfluss der Kräfte des Magnetfeldes selbst auf die Endozytose näher untersucht werden. Um zu klären, ob die beschleunigte Sedimentation der Genvektorkomplexe auf die Zelloberfläche der einzige Effekt ist, wurden die transMAG^{PEI}/DNA-Komplexe auf die Zellen zentrifugiert und anschließend mit bzw. ohne Anlegen eines magnetischen Feldes inkubiert. Interessanterweise ist die Gentransfereffizienz

hier unabhängig vom Anlegen eines Magnetfeldes. Die Kräfte des Magnetfeldes führen offensichtlich nicht zu einer verstärkten Aufnahme der Genvektorkomplexe über Endozytose, wenn die Komplexe bereits auf der Zelloberfläche akkumuliert sind. Folglich beruht die hohe Effizienz der Magnetofektion auf der beschleunigten Sedimentation der Genvektorkomplexe auf die Oberfläche der zu transfizierenden Zellen. Die Kräfte des Magnetfeldes führen nicht zu einem „Hineinziehen“ der Komplexe in die Zellen.

Die Magnetofektion vermittelt hohe Raten an Gentransfer, jedoch konnte keine Gold-markierte DNA im Zellkern detektiert werden. Dies zeigt die Nachteile der Gold-Markierung von DNA, die die Struktur der DNA beeinträchtigen kann, und verglichen mit unmarkierter DNA zu geänderten Transporteigenschaften führen kann.

4.2 Die Rolle der Caveolae für die Aufnahme bzw. den intrazellulären Transport synthetischer Genvektorkomplexe

Die Transfektionsexperimente unter Zugabe der Inhibitoren, die hemmend auf die Ausbildung der Caveolae wirken (Nystatin, Progesteron und PMA) zeigen eine Abnahme der Gentransfereffizienz *in vitro*. Die Caveolae sind offensichtlich an der Aufnahme der Genvektorkomplexe beteiligt. Um den Grad dieser Beteiligung näher zu untersuchen, wurden Kolokalisationsstudien zwischen Genvektorkomplexen und Caveolae an verschiedenen Zelllinien angefertigt.

Es ist bekannt, dass Caveolae vor allem in Endothelzellen und Typ I Pneumozyten vorkommen (Gumbleton *et al.*, 2000; Newman *et al.*, 1999; Razani *et al.*, 2002). Um etwaige Unterschiede in der Verteilung der Caveolae in unterschiedlichen Geweben aufzeigen zu können, wurden verschiedene Zelllinien verwendet: die bereits zuvor für die Inhibierungsversuche verwendeten Zelllinien HeLa, BEAS-2B und Hep-G2, sowie EA.hy 926 Zellen. Letztere sind besonders interessant für dieses Experiment, da es sich hierbei um eine Fusion von Endothelzellen und Pneumozyten handelt.

Die Größe der Genvektorkomplexe könnte in Anbetracht der Größe der Caveolae von ca. 70 nm (Carver and Schnitzer, 2003) eine wichtige Rolle spielen. Daher wurden die verwendeten Komplexe sowohl in 5 % Glucose, als auch in HBS generiert. Es wurde bereits gezeigt, dass das Solvens die Komplexgröße beeinflusst (Finsinger *et al.*, 2000; Goula *et al.*, 1998b; Ogris *et al.*, 1998; Rudolph *et al.*, 2002). Sie liegt bei in destilliertem Wasser oder in 5% Glucose hergestellten Komplexen bei 50 nm-60 nm im Durchmesser (Goula *et al.*, 1998b; Ogris *et al.*,

1998). Die Herstellung der Komplexe in HBS, einem ionischen Solvens, führt zu größeren Partikeln (> 100 nm), die aggregieren (Erbacher *et al.*, 1999; Finsinger *et al.*, 2000; Goula *et al.*, 1998b; Ogris *et al.*, 1998). Derartige Partikel sollten folglich, weil sie größer als Caveolae sind, nicht über diese zellulär aufgenommen werden. In der Tat wird dieses über fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen bestätigt. Allerdings konnte auch eine Kolokalisation zwischen Caveolae und Genvektorkomplex für die in 5 % Glucose hergestellten Komplexe festgestellt werden.

Da sich die zellulären Vorgänge *in vivo* von denen *in vitro* häufig unterscheiden, wurde nach einer Kolokalisation zwischen Caveolae und Genvektorkomplex *in vivo* gesucht. Dies ist vor dem Hintergrund zu sehen, dass die intravenöse Applikation von Genvektorkomplexen zur erfolgreichen Transfektion von Lungenparenchym, insbesondere Typ II Pneumozyten führt. Weiterhin weiß man bereits, dass Caveolae, die vor allem in Endothelzellen und Typ I Pneumozyten vorkommen, ein System darstellen, das selektiv Moleküle aus dem Blut ins darunterliegende Gewebe zu transportieren vermag (Carver and Schnitzer, 2003). Bragonzi und Kollegen (Bragonzi *et al.*, 1999) zeigten, dass die Lunge von Mäusen, insbesondere Pneumozyten, sehr effizient durch Injektion der Genvektorkomplexe in die Schwanzvene transfiziert werden kann. Sie untersuchten dabei die Effizienz von Lipo- und Polyplexen bei verschiedenen N/P-Verhältnissen und fanden heraus, dass PEI der effizienteste Genvektor ist. In Anlehnung an ihre Ergebnisse wurden hier die für den Gentransfer in die Mäuselunge effizientesten N/P-Verhältnisse verwendet. Des Weiteren konnten Zou und Kollegen zeigen, dass die Injektion von L-PEI/DNA-Komplexen, generiert in einem großen Volumen von 5 %iger Glucose, wie sie für diesen Versuch verwendet wurde, in die Schwanzvene zu einer guten Transfektionsrate in den Pneumozyten Typ II der Lunge führt (Zou *et al.*, 2000). Eine Kolokalisation zwischen Caveolae und Genvektorkomplex konnte jedoch auch hier nicht eindeutig gezeigt werden. Goula und Kollegen zeigten, dass PEI/DNA-Komplexe nach Injektion das pulmonale Endothel schnell passieren ohne es zu beschädigen und Pneumozyten transfizieren. Sie stellten die Hypothese auf, dass die Genvektorkomplexe durch den Mechanismus der Transzytose über das Endothel in das Alveolarepithel gelangen (Goula *et al.*, 2000). Wie bereits zuvor erwähnt, ist auch für Caveolae bekannt, dass sie Transzytose vermitteln. Caveolae kommen hauptsächlich in Endothelzellen und Typ I Pneumozyten vor. Es lässt sich daher spekulieren, dass Caveolae den Transport über das Endothel in das Alveolarepithel vermitteln, weswegen dieses in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde. Es stellt sich weiterhin die Frage, ob die Genvektorkomplexe ferner mittels Caveolae von der basolateralen zur apikalen Seite der Pneumozyten transportiert werden, da Caveolae auch

vermehrt in Pneumozyten vorkommen. Wäre dies der Fall, käme es allerdings zu keiner Transgenexpression in den Pneumozyten. Goula und Kollegen beobachteten jedoch eine LacZ Expression im Alveolarepithel (Goula *et al.*, 2000). Es ist daher anzunehmen, dass es zu keiner Aufnahme der Komplexe in die Caveolae kommt. Dies würde auch die fehlende Kolo-kalisation erklären. Die den Transport vom Endothel zum Alveolarepithel vermittelnde Transzytose findet vermutlich über andere Vesikel, wie „Clathrin coated pits“ statt. Caveolae spielen vermutlich eher eine geringe Rolle. Möglicherweise ist die verwendete Methode auch nicht sensitiv genug für diese Fragestellung. Es scheint so zu sein, dass bei der Aufnahme von Genvektorkomplexen verschiedene endozytotische Prozesse beteiligt sind. Neben „Clathrin coated pits“ und Caveolae werden weitere Endozytosewege beteiligt sein. Nichols und Lippincott-Schwartz (Nichols and Lippincott-Schwartz, 2001) sprechen von einer Vielfalt an Endozytosewegen, zu denen auch Makropinozytose und eine konstitutiv nicht Clathrin-vermittelte Endozytose gehören. Bei der Makropinozytose werden große, irreguläre Vesikel ausgebildet. Betrachtet man die elektronenmikroskopischen Aufnahmen (siehe 3.1 Charakterisierung des Mechanismus der Magnetofektion), so lassen sich derartige Vesikel beobachten. Der größte Teil der Genvektorkomplexe wird vermutlich über Makropinozytose aufgenommen, da die großen Vesikel in der Lage sind auch größere Genvektorkomplexe aufzunehmen.

4.3 Zytoplasmatische RNA als Voraussetzung für die Dissoziation synthetischer Genvektorkomplexe und erfolgreichen Gentransfer

Der Mechanismus des nukleären Imports von Plasmid DNA unter Verwendung synthetischer Genvektoren sollte hier näher untersucht werden. Es sollte vor allem die Besonderheit von auf PEI basierenden Genvektorkomplexen näher beleuchtet werden. Diese werden bereits seit Jahren erfolgreich für den Gentransfer eingesetzt (Boussif *et al.*, 1995). Für die Experimente wurden die N/P-Verhältnisse benutzt wie sie bereits Itaka und Kollegen (Itaka *et al.*, 2004) für ihre Versuche verwendeten. Die Autoren konnten mittels FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)-Analyse zeigen, dass sich DNA/L-PEI-Komplexe durch eine besonders schnelle Freisetzung aus den Endosomen und beschleunigter Dissoziation, d. h. PEI und DNA trennen sich voneinander, verglichen mit DNA/B-PEI-Komplexen auszeichnen. Die Frage, ob Polyplexe als Komplexe in den Zellkern gelangen oder zuvor dissoziieren wird bis heute kontrovers diskutiert. Godbey und Kollegen zeigten mittels konfokaler Mikroskopie, dass

PEI/DNA-Komplexe in einer geordneten Struktur als Komplex in den Zellkern gelangen (Godbey *et al.*, 1999). Bieber und Kollegen hingegen konnten keine PEI/DNA-Komplexe im Zellkern beobachten (Bieber *et al.*, 2002). Gold-markierte DNA-Partikel dissoziiert von PEI konnten Mishra und Kollegen mittels Elektronenmikroskopie im Zellkern nachweisen (Mishra *et al.*, 2004). Um diese Frage abschließend zu klären, sollte die potentielle Dissoziation von Polyplexen in der Anwesenheit isolierter Zellkerne untersucht werden. Da die Eigenschaften von auf PEI basierenden Genvektorkomplexen, wie ihre Stabilität im Zytoplasma, neben ihrem Einfluss auf die Endosomen, im Vordergrund standen, wurde daher ein Assay etabliert, das auf isolierten Zellkernen basiert. Dieses Assay basiert auf isolierten Zellkernen, die in der Lage sind Transkription und Translation zu betreiben, wenn ihnen die dazu benötigten Komponenten, wie u. a. tRNA, Ribosomen und Aminosäuren zur Verfügung gestellt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die isolierten Zellkerne physisch intakt und funktional sind. Die Quantifizierung der Gentransfereffizienz in diesem Assay erfolgte mittels Durchflußzytometrie. Die hier gemessene Fluoreszenz korrespondiert mit dem in die identifizierten Zellkerne diffundierten EGFP. Die gemessenen Gentransfereffizienzen der verschiedenen Vektoren nahmen in folgender Reihenfolge ab: L-PEI, B-PEI und PLL. Die Tatsache, dass L-PEI die höchste Gentransfereffizienz zeigt, kann folglich nicht alleine mit seiner hohen endosomolytischen Aktivität erklärt werden, da es im zellfreien System keine Endosomen gibt.

Dean *et al.* konnten zeigen, dass Plasmid DNA Import in den Zellkern ein sequenzabhängiger Prozess ist (Dean, 1997; Dean *et al.*, 1999). Sie identifizierten eine Region der SV40 DNA, die den „ori of replication“ und die frühen und späten Promotoren enthält, als eine den Import von Plasmid DNA unterstützende Sequenz. Diese SV40-Sequenz bindet an bestimmte Proteine (Transkriptionsfaktoren bzw. andere Sequenz-spezifische DNA-bindende Proteine) im Zytoplasma und transportiert so die Plasmid DNA durch die Zellkernporen in den Zellkern (Wilson *et al.*, 1999). Die Inkubation isolierter Zellkerne mit L-PEI/ pEGFP-N1- bzw. L-PEI/pEGFP-N1 Δ SV40-Komplexen zeigte, dass die Anwesenheit der SV40-Sequenz die Gentransfereffizienz im hier verwendeten zellfreien System signifikant steigert. Diese Ergebnisse sprechen für eine Dissoziation der Komplexe bevor die DNA in den Zellkern gelangt, da bei bestehender Komplexierung mit PEI kein Unterschied zwischen den beiden Ansätzen zu sehen sein dürfte. Denn nur wenn die SV40-Sequenz frei zugänglich ist kann sie an die zuvor erwähnten Proteine im Zytoplasma binden und so die DNA in den Zellkern transportieren.

Diese potentielle Dissoziation sollte mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie genauer untersucht werden. Nach einer 4-stündigen Inkubation der PEI/DNA-Komplexe in ZL konnte eine Akkumulation der Polymere an den Zellkernmembranen beobachtet werden. Nur wenig DNA konnte innerhalb der Zellkerne detektiert werden. Eine Ursache dafür könnte die geringe Menge an DNA sein, die das Innere des Zellkerns erreicht und damit unter der Detektionsgrenze liegt. Dennoch muss ein Teil der DNA in den Zellkern gelangt sein, da EGFP-Expression mittels Durchflußzytometrie gemessen wurde. Wenige größere DNA-Partikel sind in der Umgebung der Zellkerne zu beobachten. Die Tatsache, dass die DNA nicht wie das Polymer an der Zellkernmembran akkumuliert spricht für eine Dissoziation der Komplexe. Gibt man die pDNA/L-PEI-Komplexe zu den isolierten Zellkernen, so kann man, verglichen mit den pDNA/B-PEI-Komplexen, die fluoreszenzmarkierte DNA in unmittelbarer Nähe zu den Zellkernen beobachten. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass L-PEI die Komplexe ähnlich einer NLS gezielt zu den Zellkernen transportiert. Eine solche intrinsische Aktivität wurde bereits in der Arbeit von Wightman und Kollegen bzw. Brunner und Kollegen diskutiert (Brunner *et al.*, 2002; Wightman *et al.*, 2001).

Durch die vorangegangenen Beobachtungen stellte sich die Frage, ob zytoplasmatische Bestandteile, und wenn ja, welche für die Dissoziation der Komplexe verantwortlich sind. Durch die Analyse der Genvektorkomplexe mittels Southern Blot konnte gezeigt werden, dass die Dissoziation der Komplexe mit zunehmender Konzentration an ZL korrelierte. Offensichtlich sind Komponenten des ZL für die Freisetzung der Plasmid DNA aus den Genvektorkomplexen verantwortlich. Dies wurde bereits von Itaka und Kollegen postuliert (Itaka *et al.*, 2004). Daher stellte sich die Frage welche Komponente des ZL zur Dissoziation der Komplexe führt. Okuda und Kollegen postulierten, dass lösliche Proteine im Cytosol für eine Dissoziation von Polyplexen verantwortlich sind (Okuda *et al.*, 2004). Hiergegen spricht, dass sich Proteine eher an die Komplexe anlagern (vgl. Serum, Plasma etc.). Ein sehr wahrscheinlicher weiterer Kandidat könnte aber auch, aufgrund der Ähnlichkeit zu Struktur und Ladung der DNA, sowie des Vorkommens im Zytoplasma, RNA sein. Als Nächstes wurde daher RNA zu den Genvektorkomplexen in Transportpuffer zugegeben. Es konnte dadurch derselbe Effekt wie im ZL, nämlich die Freisetzung der DNA, beobachtet werden. In einer Zelle kommen verschiedene Arten von RNA vor. Im Wesentlichen unterscheidet man die mRNA (Boten RNA), die für Proteine kodiert, die rRNA (ribosomale RNA), die als Bestandteil der Ribosomen die Proteinsynthese katalysiert und die tRNA (Transfer RNA), die als Adapter zwischen mRNA und Aminosäuren fungiert. Ihr Vorkommen in einer typischen Säugerzelle liegt für rRNA bei 80 - 85 %, für tRNA bei 15 -20 % und für mRNA bei 1 -5 %

(Alberts, 2002). Da also der größte Anteil frei im Zytoplasma vorkommender RNA die tRNA ist und diese durch ihre partielle Doppelsträngigkeit der DNA am ähnlichsten ist, wurde der vorhergehende Versuch unter Zugabe von tRNA an Stelle von Gesamt-RNA wiederholt. Als Ergebnis kann wiederum eine Freisetzung der DNA aus den Komplexen beobachtet werden. Interessanterweise reicht schon eine geringere Menge an tRNA als an Gesamt-RNA aus um die DNA aus den Komplexen freizusetzen. Eine tRNA Menge von 50 µg ist ausreichend um die DNA von Polyplexen bestehend aus 5 µg DNA bei einem N/P-Verhältnis von 10 zu dissoziieren. Dies entspricht der Menge an Gesamt-RNA im eingesetzten Volumen an ZL, die mittels des „High Pure RNA Isolation Kit“ (Roche; Penzberg) bestimmt wurde. Abhängig vom Zelltyp liegt der Gehalt an Gesamt-RNA in 10^7 Zellen bei 120 - 350 µg (Daten; Roche, Penzberg). Für eine Anzahl an Zellkernen von 1×10^6 pro Ansatz, wie sie in den Experimenten verwendet wurden, würden *in vitro* zwischen 12 µg und 35 µg RNA zur Verfügung stehen. Die gewählten Bedingungen, d. h. 50 µg tRNA spiegeln also in etwa die Situation *in vitro* dar. Um die Hypothese, dass RNA die DNA aus den Komplexen freisetzt zu bekräftigen, wurde ZL mit RNase A vorinkubiert. Als Ergebnis konnte keine Dissoziation der Genvektorkomplexe beobachtet werden. Dies spricht für eine höhere Affinität von PEI zu RNA als zu DNA. Um auszuschließen, dass etwaige im ZL vorkommende DNA für die Freisetzung der DNA aus den Genvektorkomplexen verantwortlich ist, wurde DNA in steigenden Konzentrationen den Genvektorkomplexen zugesetzt. Dabei handelte es sich um eine andere Plasmid DNA als die die für die Präparation der Komplexe verwendet wurde. Der Effekt der Freisetzung von DNA aus den Genvektorkomplexen konnte auch hier beobachtet werden, jedoch nur durch relativ hohe Mengen an DNA (mindestens 8 µg) gegenüber 5 µg Komplex-DNA. Dies entspricht dem 8-fachen Überschuss im ZL vorkommender DNA. Auch die Menge an DNA im Zytosol *in vitro* dürfte vernachlässigbar gering sein, da die DNA ausschließlich im Zellkern und in den Mitochondrien, aber nicht im Zytosol, zu finden ist.

Die essentielle Rolle der RNA für den Gentransfer zeigt der Einfluss einer RNase A-Vorbehandlung eines Ansatzes von isolierten Zellkernen und L-PEI/DNA-Komplexen in ZL mit anschließender Inkubation dieser Zellkerne in frischem unbehandeltem ZL auf die Gentransfereffizienz. Durch den Zusatz von RNase A konnten keine EGFP-positiven Zellkerne detektiert werden, die L-PEI/DNA-Komplexe konnten nicht dissoziieren. Andernfalls hätte die DNA in die Zellkerne gelangen können und mRNA hätte während der Inkubation mit neuem ZL aus den Zellkernen in das ZL transportiert werden können, um dort translatiert zu werden. Nur in der Anwesenheit von RNA lässt sich EGFP-Expression beobachten. In Zusammenhang mit den Stabilitätsuntersuchungen der Polyplexe in

Anwesenheit von RNA, bestätigt dies die Hypothese, dass die DNA durch zytoplasmatische RNA kompetitiv aus der Bindung mit PEI verdrängt wird, und unkomplexiert in den Zellkern gelangt.

Die Unterschiede in der Stabilität der auf B-PEI, L-PEI bzw. PLL basierenden Genvektorkomplexe korreliert interessanterweise mit den erzielten Gentransfereffizienzen *in vitro*. Die Stabilität der Komplexe nimmt von B-PEI/DNA- über L-PEI/DNA- zu PLL/DNA-Komplexen ab. Der auf L-PEI basierende Genvektorkomplex zeigt die höchste Gentransfereffizienz gefolgt von den auf B-PEI und PLL basierenden Genvektorkomplexen. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass der L-PEI/DNA-Komplex weniger stabil ist als der B-PEI/DNA-Komplex, d. h. die DNA leichter aus dem L-PEI/DNA-Komplex freigesetzt wird. Der auf PLL basierende Komplex zeigt die geringste Stabilität, aber auch die niedrigste Gentransfereffizienz der verwendeten Genvektoren. Dieses Ergebnis scheint auf den ersten Blick widersprüchlich zu sein, da gerade dieser Vektor die geringste Gentransfereffizienz aufweist. Eine mögliche Erklärung hierfür ist jedoch eine besonders hohe Instabilität dieses Komplexes, so dass die DNA im Zytoplasma durch Nukleasen abgebaut wird bevor sie in den Zellkern gelangen kann. Lechardeur und Kollegen (Lechardeur *et al.*, 1999) konnten zeigen, dass die Halbwertszeit von pDNA in HeLa und COS Zellen ca. 50 min – 90 min beträgt. Ein ähnlicher Wert dürfte für 16HBE14o⁻ Zellen gelten. Hinzu kommt, dass die DNA bei auf PLL basierenden Genvektorkomplexen nur schlecht aus den Endosomen freigesetzt wird.

4.4 Postulierter Mechanismus der zellulären Aufnahme, des intrazellulären Transports und der zytosolischen Dissoziation synthetischer Genvektorkomplexe

Im nachfolgenden Kapitel soll der postulierte Mechanismus der zellulären Aufnahme, des intrazellulären Transports und der anschließenden Dissoziation synthetischer Genvektorkomplexe im Zytoplasma zusammengefasst werden.

Für Polyplexe wurde wie bereits eingangs erwähnt ein endozytotischer Aufnahmemechanismus gezeigt, der wahrscheinlich über Heparansulfat-Proteoglykan-Rezeptoren bzw. Syndekane vermittelt wird (Kopatz *et al.*, 2004; Mislick and Baldeschwieler, 1996). Nach Bindung der Polyplexe an die Heparansulfat-Proteoglykan-Rezeptoren folgt die zelluläre Internalisierung mit Hilfe von Aktinfilamenten durch Ausbildung von endozytotischen Vesikeln (Durrbach *et al.*, 1996; Kopatz *et al.*, 2004). Die Polyplexe werden

dem Weg der Endozytose folgend in Endosomen, mit Hilfe von Mikrotubuli (Durrbach *et al.*, 1996; Suh *et al.*, 2003), weiter in das Zellinnere in die Nähe des Zellkerns transportiert. Auf PEI basierende Polyplexe führen aufgrund ihrer hohen Pufferkapazität zur Endosomolyse durch eine massive Akkumulation von Protonen in den Endosomen (Kichler *et al.*, 2001), gefolgt von einem passiven Einströmen von Chlorid-Ionen und Wasser. Durch das osmotische Anschwellen der Endosomen platzen diese schließlich (Merdan *et al.*, 2002). Dies führt zur Freisetzung der Genvektorkomplexe in das Zytoplasma und ist die Voraussetzung dafür, dass die DNA in den Zellkern gelangen kann (Suh *et al.*, 2003). Dieser Effekt wird als „Protonenschwammefekt“ bezeichnet. (Bieber *et al.*, 2002; Boussif *et al.*, 1995; Merdan *et al.*, 2002; Sonawane *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Genvektorkomplexe in der Anwesenheit von ZL dissoziieren, und wahrscheinlich nur die DNA, aber nicht der Carrier, das Innere des Zellkerns erreicht. Für diese Dissoziation scheint die Anwesenheit von RNA notwendig zu sein. Offensichtlich setzt die zytosolische RNA in der Zelle die DNA durch kompetitives Verdrängen aus den Komplexen frei. Die DNA gelangt unkomplexiert in den Zellkern, wo sie transkribiert wird. Damit wäre zum ersten Mal die Frage geklärt, in welcher Form die DNA in den Zellkern gelangt. Abbildung 30 zeigt eine schematische Darstellung des postulierten Mechanismus.

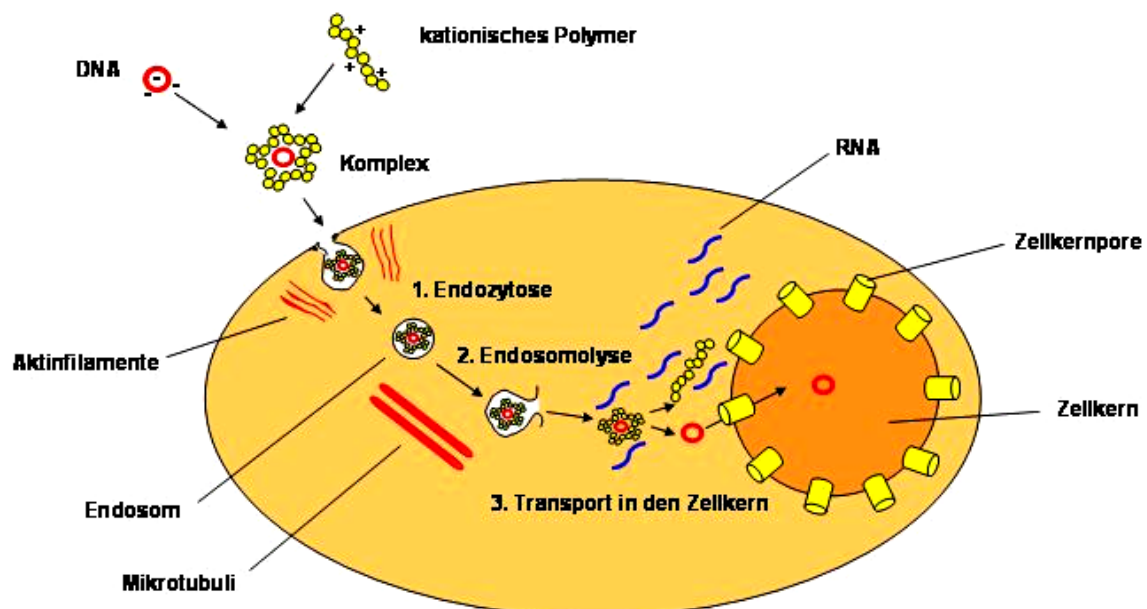


Abbildung 30: Hypothetische Darstellung der zellulären Aufnahme, des intrazellulären Transports und der anschließenden Dissoziation synthetischer Genvektorkomplexe im Zytoplasma.

5. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zunächst den Mechanismus der Methode der Magnetofektion aufzuklären. Es sollte insbesondere untersucht werden, ob die Aufnahme und der intrazelluläre Transport der transMAG^{PEI}/DNA-Komplexe ebenso wie bei der Transfektion mit auf PEI basierenden Genvektorkomplexen auf Endozytose beruht.

In Bezug auf die Charakterisierung der Magnetofektion lässt sich festhalten, dass die transMAG^{PEI}/DNA-Komplexe überwiegend über Makropinozytose von den Zellen aufgenommen werden. Sowohl Clathrin-, als auch Caveolae-abhängige Endozytose, wie auch das Zytoskelett sind in die Aufnahme und den Transport der transMAG^{PEI}/DNA-Komplexe innerhalb der Zelle involviert. Das Ausmaß in dem die verschiedenen Endozytosewege beteiligt sind, hängt stark von der zu transfizierenden Zelllinie ab. Grundsätzlich unterscheidet sich der Mechanismus der Aufnahme der Genvektorkomplexe zwischen Transfektion und Magnetofektion nicht. Die Kräfte des Magnetfeldes führen zu einer beschleunigten Akkumulation der Komplexe auf der Zelloberfläche, nicht jedoch zu einem „Hineinziehen“ der Komplexe in die Zellen. Die Methode der Magnetofektion hat das Potential eine gezielte Genexpression in einem bestimmten Organ oder Gewebe *in vivo* zu erreichen.

Als Nächstes sollte die Rolle der Caveolae für die Aufnahme synthetischer Genvektorkomplexe im Detail analysiert werden. Dabei wurden auch eventuelle Unterschiede der zellulären Vorgänge zwischen den Versuchsbedingungen *in vitro* und *in vivo* berücksichtigt.

Die Vermutung, dass Caveolae eine bedeutende Rolle in der Aufnahme bzw. dem intrazellulären Transport synthetischer Genvektorkomplexe spielen, konnte weder *in vitro* noch *in vivo* bestätigt werden. Aufgrund der Größe der Genvektorkomplexe scheint die Aufnahme primär über unspezifische endozytotische Vesikel zu erfolgen. Die Ergebnisse der Transfektionen in Anwesenheit von Endozytoseinhibitoren zeigen jedoch, dass auch andere Endozytosewege wie die über „Clathrin coated pits“ und Caveolae beteiligt sind. Diese Beteiligung findet wahrscheinlich in einem weitaus geringeren Maße statt als die der unspezifischen Endozytose. Die Tatsache, dass es nicht möglich war eine Kolo-kalisation

zwischen Genvektorkomplex und Caveolae nachzuweisen liegt womöglich an der Sensitivität der Methode. Zusammengefasst lässt sich hier also festhalten, dass die Aufnahme synthetischer Genvektorkomplexe über eine Mischform verschiedener Endozytosewege erfolgt.

Schließlich sollte der Transport der DNA unter Verwendung synthetischer Genvektoren in den Zellkern untersucht werden. Dabei stellte sich insbesondere die Frage an welcher Stelle während der Transfektion die Dissoziation der Genvektorkomplexe respektive das Freisetzen der DNA aus diesen Komplexen stattfinden. Diese Dissoziation ist die Voraussetzung für die Transkription bzw. Translation der entsprechenden Gene (Bieber *et al.*, 2002).

Ein zellfreies System unter Verwendung isolierter Zellkerne, konnte erfolgreich etabliert werden, um die zuvor erwähnten Fragestellungen zu bearbeiten. Es erlaubt die mikroskopische Betrachtung der Vorgänge zwischen Genvektorkomplex und Zellkern ohne den störenden Einfluss des Zytoskeletts oder endozytotischer Vesikel. Eine Quantifizierung der Gentransfereffizienz ist über Durchflußzytometrie möglich.

Es konnte gezeigt werden, dass die Genvektorkomplexe in der Anwesenheit von ZL dissoziieren, und nur die DNA, aber nicht der Carrier, das Innere des Zellkerns erreicht. Weiter konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von RNA zum Freisetzen der DNA aus den Komplexen führt. Offensichtlich setzt die zytosolische RNA in der Zelle die DNA durch kompetitives Verdrängen aus den Komplexen frei, und ist damit ein unerlässlicher Faktor für den erfolgreichen Gentransfer mit kationischen Polymer-Vektoren. Diese Arbeit liefert damit einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des Transfektionsmechanismus von auf kationischen Polymeren basierenden Genvektorsystemen.

6. Literatur

- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter.** 2002. In: *Molecular Biology of the Cell*, Fourth Edition, Garland Science, Taylor & Francis group.
- Anderson, R. G.** 1998. The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* **67**:199-225.
- Bieber, T., W. Meissner, S. Kostin, A. Niemann, and H. P. Elsasser.** 2002. Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine- DNA complexes. *J Control Release* **82**:441-54.
- Blaese, R. M., K. W. Culver, A. D. Miller, C. S. Carter, T. Fleisher, M. Clerici, G. Shearer, L. Chang, Y. Chiang, P. Tolstoshev, and et al.** 1995. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science* **270**:475-80.
- Boussif, O., F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, and J. P. Behr.** 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:7297-301.
- Bragonzi, A., A. Boletta, A. Biffi, A. Muggia, G. Sersale, S. H. Cheng, C. Bordinon, B. M. Assael, and M. Conese.** 1999. Comparison between cationic polymers and lipids in mediating systemic gene delivery to the lungs. *Gene Ther* **6**:1995-2004.
- Bremner, K. H., L. W. Seymour, and C. W. Pouton.** 2001. Harnessing nuclear localization pathways for transgene delivery. *Curr Opin Mol Ther* **3**:170-7.
- Brunner, S., E. Furtbauer, T. Sauer, M. Kursa, and E. Wagner.** 2002. Overcoming the nuclear barrier: cell cycle independent nonviral gene transfer with linear polyethylenimine or electroporation. *Mol Ther* **5**:80-6.

- Brunner, S., T. Sauer, S. Carotta, M. Cotten, M. Saltik, and E. Wagner.** 2000. Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus. *Gene Ther* **7**:401-7.
- Budker, V., T. Budker, G. Zhang, V. Subbotin, A. Loomis, and J. A. Wolff.** 2000. Hypothesis: naked plasmid DNA is taken up by cells in vivo by a receptor-mediated process. *J Gene Med* **2**:76-88.
- Capecchi, M. R.** 1980. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell* **22**:479-88.
- Caplen, N. J.** 2004. Gene therapy progress and prospects. Downregulating gene expression: the impact of RNA interference. *Gene Ther* **11**:1241-8.
- Cartier, R., and R. Reszka.** 2002. Utilization of synthetic peptides containing nuclear localization signals for nonviral gene transfer systems. *Gene Ther* **9**:157-67.
- Carver, L. A., and J. E. Schnitzer.** 2003. Caveolae: mining little caves for new cancer targets. *Nat Rev Cancer* **3**:571-81.
- Cavazzana-Calvo, M., S. Hacein-Bey, G. de Saint Basile, F. Gross, E. Yvon, P. Nusbaum, F. Selz, C. Hue, S. Certain, J. L. Casanova, P. Bousso, F. L. Deist, and A. Fischer.** 2000. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* **288**:669-72.
- Cavazzana-Calvo, M., A. Thrasher, and F. Mavilio.** 2004. The future of gene therapy. *Nature* **427**:779-81.
- Check, E.** 2005. Gene therapy put on hold as third child develops cancer. *Nature* **433**:561.
- Choosakoonkriang, S., B. A. Lobo, G. S. Koe, J. G. Koe, and C. R. Middaugh.** 2003. Biophysical characterization of PEI/DNA complexes. *J Pharm Sci* **92**:1710-22.
- Conner, S. D., and S. L. Schmid.** 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **422**:37-44.

- Dean, D. A.** 1997. Import of plasmid DNA into the nucleus is sequence specific. *Exp Cell Res* **230**:293-302.
- Dean, D. A., B. S. Dean, S. Muller, and L. C. Smith.** 1999. Sequence requirements for plasmid nuclear import. *Exp Cell Res* **253**:713-22.
- Detilleux, P. G., B. L. Deyoe, and N. F. Cheville.** 1991. Effect of endocytic and metabolic inhibitors on the internalization and intracellular growth of *Brucella abortus* in Vero cells. *Am J Vet Res* **52**:1658-64.
- Drabick, J. J., J. Glasspool-Malone, A. King, and R. W. Malone.** 2001. Cutaneous transfection and immune responses to intradermal nucleic acid vaccination are significantly enhanced by in vivo electroporation. *Mol Ther* **3**:249-55.
- Durrbach, A., D. Louvard, and E. Coudrier.** 1996. Actin filaments facilitate two steps of endocytosis. *J Cell Sci* **109**:457-65.
- Edelstein, M. L., M. R. Abedi, J. Wixon, and R. M. Edelstein.** 2004. Gene therapy clinical trials worldwide 1989-2004-an overview. *J Gene Med* **6**:597-602.
- Elouahabi, A., and J. M. Ruyschaert.** 2005. Formation and intracellular trafficking of lipoplexes and polyplexes. *Mol Ther* **11**:336-47.
- Erbacher, P., T. Bettinger, P. Belguise-Valladier, S. Zou, J. L. Coll, J. P. Behr, and J. S. Remy.** 1999. Transfection and physical properties of various saccharide, poly(ethylene glycol), and antibody-derivatized polyethylenimines (PEI). *J Gene Med* **1**:210-22.
- Felgner, P. L., T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold, and M. Danielsen.** 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:7413-7.
- Ferrari, A., V. Pellegrini, C. Arcangeli, A. Fittipaldi, M. Giacca, and F. Beltram.** 2003. Caveolae-mediated internalization of extracellular HIV-1 tat fusion proteins visualized in real time. *Mol Ther* **8**:284-94.

- Ferrari, S., D. M. Geddes, and E. W. Alton.** 2002. Barriers to and new approaches for gene therapy and gene delivery in cystic fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev* **54**:1373-93.
- Finsinger, D., J. S. Remy, P. Erbacher, C. Koch, and C. Plank.** 2000. Protective copolymers for nonviral gene vectors: synthesis, vector characterization and application in gene delivery. *Gene Ther* **7**:1183-92.
- Forrest, M. L., and D. W. Pack.** 2002. On the kinetics of polyplex endocytic trafficking: implications for gene delivery vector design. *Mol Ther* **6**:57-66.
- Gersting, S. W., U. Schillinger, J. Lausier, P. Nicklaus, C. Rudolph, C. Plank, D. Reinhardt, and J. Rosenecker.** 2004. Gene delivery to respiratory epithelial cells by magnetofection. *J Gene Med* **6**:913-22.
- Godbey, W. T., K. K. Wu, and A. G. Mikos.** 1999. Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:5177-81.
- Gorlich, D., and U. Kutay.** 1999. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**:607-60.
- Goula, D., N. Becker, G. F. Lemkine, P. Normandie, J. Rodrigues, S. Mantero, G. Levi, and B. A. Demeneix.** 2000. Rapid crossing of the pulmonary endothelial barrier by polyethylenimine/DNA complexes. *Gene Ther* **7**:499-504.
- Goula, D., C. Benoist, S. Mantero, G. Merlo, G. Levi, and B. A. Demeneix.** 1998a. Polyethylenimine-based intravenous delivery of transgenes to mouse lung. *Gene Ther* **5**:1291-5.
- Goula, D., J. S. Remy, P. Erbacher, M. Wasowicz, G. Levi, B. Abdallah, and B. A. Demeneix.** 1998b. Size, diffusibility and transfection performance of linear PEI/DNA complexes in the mouse central nervous system. *Gene Ther* **5**:712-7.
- Griesenbach, U., D. M. Geddes, and E. W. Alton.** 2004. Gene therapy for cystic fibrosis: an example for lung gene therapy. *Gene Ther* **11 Suppl 1**:S43-50.

- Groth, A. C., E. C. Olivares, B. Thyagarajan, and M. P. Calos.** 2000. A phage integrase directs efficient site-specific integration in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:5995-6000.
- Gumbleton, M., A. G. Abulrob, and L. Campbell.** 2000. Caveolae: an alternative membrane transport compartment. *Pharm Res* **17**:1035-48.
- Hacein-Bey-Abina, S., C. von Kalle, M. Schmidt, F. Le Deist, N. Wulffraat, E. McIntyre, I. Radford, J. L. Villeval, C. C. Fraser, M. Cavazzana-Calvo, and A. Fischer.** 2003a. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* **348**:255-6.
- Hacein-Bey-Abina, S., C. Von Kalle, M. Schmidt, M. P. McCormack, N. Wulffraat, P. Leboulch, A. Lim, C. S. Osborne, R. Pawliuk, E. Morillon, R. Sorensen, A. Forster, P. Fraser, J. I. Cohen, G. de Saint Basile, I. Alexander, U. Wintergerst, T. Frebourg, A. Aurias, D. Stoppa-Lyonnet, S. Romana, I. Radford-Weiss, F. Gross, F. Valensi, E. Delabesse, E. Macintyre, F. Sigaux, J. Soulier, L. E. Leiva, M. Wissler, C. Prinz, T. H. Rabbitts, F. Le Deist, A. Fischer, and M. Cavazzana-Calvo.** 2003b. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* **302**:415-9.
- Hasegawa, S., N. Hirashima, and M. Nakanishi.** 2001. Microtubule involvement in the intracellular dynamics for gene transfection mediated by cationic liposomes. *Gene Ther* **8**:1669-73.
- Hedin, U., and J. Thyberg.** 1985. Receptor-mediated endocytosis of immunoglobulin-coated colloidal gold particles in cultured mouse peritoneal macrophages. Chloroquine and monensin inhibit transfer of the ligand from endocytic vesicles to lysosomes. *Eur J Cell Biol* **39**:130-5.
- Hofman, C. R., J. P. Dileo, Z. Li, S. Li, and L. Huang.** 2001. Efficient in vivo gene transfer by PCR amplified fragment with reduced inflammatory activity. *Gene Ther* **8**:71-4.

Itaka, K., A. Harada, Y. Yamasaki, K. Nakamura, H. Kawaguchi, and K. Kataoka.

2004. In situ single cell observation by fluorescence resonance energy transfer reveals fast intra-cytoplasmic delivery and easy release of plasmid DNA complexed with linear polyethylenimine. *J Gene Med* **6**:76-84.

Kichler, A., C. Leborgne, E. Coeytaux, and O. Danos. 2001. Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study. *J Gene Med* **3**:135-44.

Kirchheis, R., A. Kichler, G. Wallner, M. Kursa, M. Ogris, T. Felzmann, M. Buchberger, and E. Wagner. 1997. Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery. *Gene Ther* **4**:409-18.

Kirchheis, R., L. Wightman, and E. Wagner. 2001. Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines. *Adv Drug Deliv Rev* **53**:341-58.

Kopatz, I., J. S. Remy, and J. P. Behr. 2004. A model for non-viral gene delivery: through syndecan adhesion molecules and powered by actin. *J Gene Med* **6**:769-76.

Lechardeur, D., K. J. Sohn, M. Haardt, P. B. Joshi, M. Monck, R. W. Graham, B.

Beatty, J. Squire, H. O'Brodvich, and G. L. Lukacs. 1999. Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Ther* **6**:482-97.

Lee, H., J. H. Jeong, and T. G. Park. 2001. A new gene delivery formulation of polyethylenimine/DNA complexes coated with PEG conjugated fusogenic peptide. *J Control Release* **76**:183-92.

Lin, M. T., L. Pulkkinen, J. Uitto, and K. Yoon. 2000. The gene gun: current applications in cutaneous gene therapy. *Int J Dermatol* **39**:161-70.

Matsui, H., L. G. Johnson, S. H. Randell, and R. C. Boucher. 1997. Loss of binding and entry of liposome-DNA complexes decreases transfection efficiency in differentiated airway epithelial cells. *J Biol Chem* **272**:1117-26.

Maxfield, F. R. 1982. Weak bases and ionophores rapidly and reversibly raise the pH of endocytic vesicles in cultured mouse fibroblasts. *J Cell Biol* **95**:676-81.

- Mellman, I.** 1996. Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**:575-625.
- Merdan, T., K. Kunath, D. Fischer, J. Kopecek, and T. Kissel.** 2002. Intracellular processing of poly(ethylene imine)/ribozyme complexes can be observed in living cells by using confocal laser scanning microscopy and inhibitor experiments. *Pharm Res* **19**:140-6.
- Mishra, S., P. Webster, and M. E. Davis.** 2004. PEGylation significantly affects cellular uptake and intracellular trafficking of non-viral gene delivery particles. *Eur J Cell Biol* **83**:97-111.
- Mislick, K. A., and J. D. Baldeschwieler.** 1996. Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:12349-54.
- Newman, G. R., L. Campbell, C. von Ruhland, B. Jasani, and M. Gumbleton.** 1999. Caveolin and its cellular and subcellular immunolocalisation in lung alveolar epithelium: implications for alveolar epithelial type I cell function. *Cell Tissue Res* **295**:111-20.
- Nichols, B. J., and J. Lippincott-Schwartz.** 2001. Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol* **11**:406-12.
- Niidome, T., and L. Huang.** 2002. Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Ther* **9**:1647-52.
- Ogris, M., P. Steinlein, S. Carotta, S. Brunner, and E. Wagner.** 2001. DNA/polyethylenimine transfection particles: influence of ligands, polymer size, and PEGylation on internalization and gene expression. *AAPS PharmSci* **3**:E21.
- Ogris, M., P. Steinlein, M. Kursa, K. Mechtler, R. Kircheis, and E. Wagner.** 1998. The size of DNA/transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells. *Gene Ther* **5**:1425-33.
- Okuda, T., T. Niidome, and H. Aoyagi.** 2004. Cytosolic soluble proteins induce DNA release from DNA--gene carrier complexes. *J Control Release* **98**:325-32.

- Olbrich, C., U. Bakowsky, C. M. Lehr, R. H. Muller, and C. Kneuer.** 2001. Cationic solid-lipid nanoparticles can efficiently bind and transfect plasmid DNA. *J Control Release* **77**:345-55.
- Parton, R. G.** 2003. Caveolae--from ultrastructure to molecular mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:162-7.
- Plank, C., F. Scherer, U. Schillinger, C. Bergemann, and M. Anton.** 2003a. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery with superparamagnetic nanoparticles and magnetic fields. *J Liposome Res* **13**:29-32.
- Plank, C., U. Schillinger, F. Scherer, C. Bergemann, J. S. Remy, F. Krotz, M. Anton, J. Lausier, and J. Rosenecker.** 2003b. The magnetofection method: using magnetic force to enhance gene delivery. *Biol Chem* **384**:737-47.
- Pollard, H., G. Toumaniantz, J. L. Amos, H. Avet-Loiseau, G. Guihard, J. P. Behr, and D. Escande.** 2001. Ca²⁺-sensitive cytosolic nucleases prevent efficient delivery to the nucleus of injected plasmids. *J Gene Med* **3**:153-64.
- Poole, B., and S. Ohkuma.** 1981. Effect of weak bases on the intralysosomal pH in mouse peritoneal macrophages. *J Cell Biol* **90**:665-9.
- Poole, B., S. Ohkuma, and M. J. Warburton.** 1977. The accumulation of weakly basic substances in lysosomes and the inhibition of intracellular protein degradation. *Acta Biol Med Ger* **36**:1777-88.
- Povey, A. C., H. Bartsch, J. R. Nixon, and I. K. O'Neill.** 1986. Trapping of chemical carcinogens with magnetic polyethyleneimine microcapsules: I. Microcapsule preparation and in vitro reactivity of encapsulated nucleophiles. *J Pharm Sci* **75**:831-7.
- Raper, S. E., N. Chirmule, F. S. Lee, N. A. Wivel, A. Bagg, G. P. Gao, J. M. Wilson, and M. L. Batshaw.** 2003. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* **80**:148-58.

- Razani, B., S. E. Woodman, and M. P. Lisanti.** 2002. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev* **54**:431-67.
- Riordan, J. R., J. M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plavsic, J. L. Chou, and et al.** 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**:1066-73.
- Rosenberg, S. A., P. Aebersold, K. Cornetta, A. Kasid, R. A. Morgan, R. Moen, E. M. Karson, M. T. Lotze, J. C. Yang, S. L. Topalian, and et al.** 1990. Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med* **323**:570-8.
- Rudolph, C., R. H. Muller, and J. Rosenecker.** 2002. Jet nebulization of PEI/DNA polyplexes: physical stability and in vitro gene delivery efficiency. *J Gene Med* **4**:66-74.
- Rudolph, C., U. Schillinger, A. Ortiz, K. Tabatt, C. Plank, R. H. Muller, and J. Rosenecker.** 2004. Application of novel solid lipid nanoparticle (SLN)-gene vector formulations based on a dimeric HIV-1 TAT-peptide in vitro and in vivo. *Pharm Res* **21**:1662-9.
- Scherer, F., M. Anton, U. Schillinger, J. Henke, C. Bergemann, A. Kruger, B. Gansbacher, and C. Plank.** 2002. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther* **9**:102-9.
- Schnitzer, J. E., P. Oh, E. Pinney, and J. Allard.** 1994. Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J Cell Biol* **127**:1217-32.

- Simoës, S., V. Slepishkin, N. Duzgunes, and M. C. Pedrosa de Lima.** 2001. On the mechanisms of internalization and intracellular delivery mediated by pH-sensitive liposomes. *Biochim Biophys Acta* **1515**:23-37.
- Smart, E. J., K. Estes, and R. G. Anderson.** 1995. Inhibitors that block both the internalization of caveolae and the return of plasmalemmal vesicles. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **60**:243-8.
- Smart, E. J., D. C. Foster, Y. S. Ying, B. A. Kamen, and R. G. Anderson.** 1994. Protein kinase C activators inhibit receptor-mediated potocytosis by preventing internalization of caveolae. *J Cell Biol* **124**:307-13.
- Smart, E. J., Y. Ying, W. C. Donzell, and R. G. Anderson.** 1996. A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem* **271**:29427-35.
- Sodeik, B., M. W. Ebersold, and A. Helenius.** 1997. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol* **136**:1007-21.
- Somiari, S., J. Glasspool-Malone, J. J. Drabick, R. A. Gilbert, R. Heller, M. J. Jaroszeski, and R. W. Malone.** 2000. Theory and in vivo application of electroporative gene delivery. *Mol Ther* **2**:178-87.
- Sonawane, N. D., F. C. Szoka, Jr., and A. S. Verkman.** 2003. Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *J Biol Chem* **278**:44826-31.
- Song, J., J. C. Chappell, M. Qi, E. J. VanGieson, S. Kaul, and R. J. Price.** 2002. Influence of injection site, microvascular pressure and ultrasound variables on microbubble-mediated delivery of microspheres to muscle. *J Am Coll Cardiol* **39**:726-31.
- Stenseth, K., and J. Thyberg.** 1989. Monensin and chloroquine inhibit transfer to lysosomes of endocytosed macromolecules in cultured mouse peritoneal macrophages. *Eur J Cell Biol* **49**:326-33.

Strous, G. J., A. Du Maine, J. E. Zijderhand-Bleekemolen, J. W. Slot, and A. L.

Schwartz. 1985. Effect of lysosomotropic amines on the secretory pathway and on the recycling of the asialoglycoprotein receptor in human hepatoma cells. *J Cell Biol* **101**:531-9.

Suh, J., D. Wirtz, and J. Hanes. 2003. Efficient active transport of gene nanocarriers to the cell nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:3878-82.

Surovoy, A., I. Flechsler, F. Gaunitz, M. Papke, and G. Jung. 1998. Simple and fast microscale procedure for transfection and quantification of reporter gene expression in eukaryotic cells. *Adv Exp Med Biol* **451**:457-60.

Tachibana, R., H. Harashima, Y. Shinohara, and H. Kiwada. 2001. Quantitative studies on the nuclear transport of plasmid DNA and gene expression employing nonviral vectors. *Adv Drug Deliv Rev* **52**:219-26.

Tammi, R., K. Rilla, J. P. Pienimäki, D. K. MacCallum, M. Hogg, M. Luukkonen, V. C. Hascall, and M. Tammi. 2001. Hyaluronan enters keratinocytes by a novel endocytic route for catabolism. *J Biol Chem* **276**:35111-22.

Tang, M. X., and F. C. Szoka. 1997. The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Ther* **4**:823-32.

Thyagarajan, B., E. C. Olivares, R. P. Hollis, D. S. Ginsburg, and M. P. Calos. 2001. Site-specific genomic integration in mammalian cells mediated by phage phiC31 integrase. *Mol Cell Biol* **21**:3926-34.

Thyberg, J., U. Hedin, and K. Stenseth. 1985. Endocytic pathways and time sequence of lysosomal transfer of macromolecules in cultured mouse peritoneal macrophages. Double-labeling experiments with horseradish peroxidase and ferritin. *Cell Tissue Res* **241**:299-303.

- Turk, M. J., J. A. Reddy, J. A. Chmielewski, and P. S. Low.** 2002. Characterization of a novel pH-sensitive peptide that enhances drug release from folate-targeted liposomes at endosomal pHs. *Biochim Biophys Acta* **1559**:56-68.
- Ungaro, F., G. De Rosa, A. Miro, and F. Quaglia.** 2003. Spectrophotometric determination of polyethylenimine in the presence of an oligonucleotide for the characterization of controlled release formulations. *J Pharm Biomed Anal* **31**:143-9.
- Wibo, M., and B. Poole.** 1974. Protein degradation in cultured cells. II. The uptake of chloroquine by rat fibroblasts and the inhibition of cellular protein degradation and cathepsin B1. *J Cell Biol* **63**:430-40.
- Wightman, L., R. Kircheis, V. Rossler, S. Carotta, R. Ruzicka, M. Kurs, and E. Wagner.** 2001. Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. *J Gene Med* **3**:362-72.
- Wilson, G. L., B. S. Dean, G. Wang, and D. A. Dean.** 1999. Nuclear import of plasmid DNA in digitonin-permeabilized cells requires both cytoplasmic factors and specific DNA sequences. *J Biol Chem* **274**:22025-32.
- Wolff, J. A., R. W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsadi, A. Jani, and P. L. Felgner.** 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* **247**:1465-8.
- Wu, G. Y., and C. H. Wu.** 1987. Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J Biol Chem* **262**:4429-32.
- Yamada, E.** 1955. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol* **1**:445-58.
- Yew, N. S., H. Zhao, I. H. Wu, A. Song, J. D. Tousignant, M. Przybylska, and S. H. Cheng.** 2000. Reduced inflammatory response to plasmid DNA vectors by elimination and inhibition of immunostimulatory CpG motifs. *Mol Ther* **1**:255-62.

Zabner, J., A. J. Fasbender, T. Moninger, K. A. Poellinger, and M. J. Welsh. 1995.

Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J Biol Chem* **270**:18997-9007.

Zou, S. M., P. Erbacher, J. S. Remy, and J. P. Behr. 2000. Systemic linear

polyethylenimine (L-PEI)-mediated gene delivery in the mouse. *J Gene Med* **2**:128-34.

Anhang: Bezugsliste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

ATP	P.J.K. GmbH, Kleinbittersdorf
Coenzym A	P.J.K. GmbH, Kleinbittersdorf
D-Luziferin	P.J.K. GmbH, Kleinbittersdorf
DMEM	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
FCS	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
Gentamicin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Glucose (5 %)	DeltaSelect, Pfullingen
Kreatinphosphat	Roche, Penzberg
MEM	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Natriumcitrat Dihydrat	Roth, Karlsruhe
PBS	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Tris	Merck, Darmstadt
Trypsin-EDTA	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe

Alle übrigen Chemikalien und Reagenzien wurden, falls im Text nicht anders erwähnt, über Sigma-Aldrich, Schnelldorf bezogen.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Dietrich Reinhardt danke ich für die freundliche Übernahme der Rolle des Doktorvaters und die stete Unterstützung des Forschungszentrum Kubus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital.

Bei Herrn Priv. Doz. Dr. Joseph Rosenecker möchte ich mich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe „Molekulare Pneumologie“, die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Möglichkeit an nationalen, sowie internationalen Kongressen teilzunehmen sehr herzlich bedanken.

Herrn Dr. Carsten Rudolph danke ich für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung der Arbeit, sowie für zahlreiche Anregungen und Diskussionen. Durch sein kontinuierliches Interesse am Fortgang dieser Arbeit, seine Hilfsbereitschaft und sein großes Fachwissen entstand ein produktives Arbeitsklima, das mich stets sehr motiviert hat.
Vielen lieben Dank für alles! „Es hat Spaß gebracht!“

Bei Herrn James Lausier, Dr. Søren Gersting, Prof. Dr. Ulrich Welsch bzw. Frau Sabine Hertzmann und Dr. Christian Plank möchte ich mich für die Unterstützung bei den elektronenmikroskopischen Aufnahmen bzw. den Magnetofektions-Experimenten bedanken.

Frau Dr. Ulrike Schillinger danke ich für die Hilfe bei den *in vivo*-Versuchen.

Herrn Dr. Florian Hoffmann danke ich für die erste Hilfestellung bei den FACS-Analysen.

Bei Herrn Dr. Andreas Laner möchte ich mich für die freundliche Überlassung des Plasmids pEGFP-N1 Δ SV40 bedanken.

Der Arbeitsgruppe von Frau Priv. Doz. Dr. Daniele Zink danke ich für die Möglichkeit ihr konfokales Laser-Scanning-Mikroskop nutzen zu dürfen.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen weiteren derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Molekulare Pneumologie“:

Sven Bullerjahn, Petra Dames, Eugenia Lesina, Dr. Christa Schmidt, Christof Maucksch, und Markus Elfinger;

sowie den Mediziner:

Tina Meyer, Aurora Ortiz, Corinna Pauls, Wolfgang (Wolle) Schuster und Johannes Matschke für das gute Arbeitsklima innerhalb der Gruppe.

Mein besonderer Dank gilt Sabine (Sabi) Weiss für die schöne und lustige Zeit, die ich mit ihr in der Arbeitsgruppe verbracht habe, sowie für ihre moralische Unterstützung in allen Lebenslagen. Vielen lieben Dank dafür!

Schließlich danke ich allen namentlich nicht erwähnten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Forschungszentrum Kubus für die gute Zusammenarbeit und das nette Arbeitsklima.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Stephanie Huth
Geburtsdatum	10.01.1976
Geburtsort	Würzburg

Schul Ausbildung

09/82-07/86	Grundschule (Würzburg/Heuchelhof)
09/86-06/95	Christoph-Probst-Gymnasium (Gilching)
30.06.1995	Allgemeine Hochschulreife

FÖJ

02/96-08/96	Freiwilliges Ökologisches Jahr (FÖJ) am Umweltstudienplatz/Jugendherberge Prien am Chiemsee
-------------	--

Studium

10/95-01/96	Diplom-Studiengang Maschinenbau (FH München)
11/96-06/02	Diplom-Studiengang Biologie (LMU München)
16.11.1998	Diplom-Vorprüfung
08/01-06/02	Diplomarbeit am Department Biologie I, Bereich Mikrobiologie der LMU München unter der Anleitung von Prof. Dr. A. Böck; Thema: „Untersuchungen zum Eiseneinbau in Nickel-Eisen-Hydrogenasen von <i>Escherichia coli</i> “
06.06.2002	Diplom-Hauptprüfung

Dissertation

seit 09/02	Anfertigung der Dissertation im Forschungszentrum Kubus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital, Arbeitsgruppe Molekulare Pneumologie unter der Leitung von Priv. Doz. Dr. J. Rosenecker (LMU München)
------------	--